

PCT/JP 2004/015221

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

18.10.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 3 年 1 0 月 1 5 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 3 5 4 9 8 3
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 5 4 9 8 3]

出 願 人
Applicant(s): 財団法人新産業創造研究機構

REC'D 09 DEC 2004	
WIPO	PCT

BEST AVAILABLE COPY

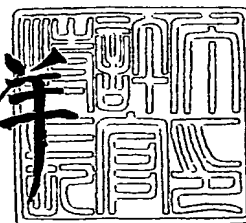
**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 1 月 2 5 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川

洋



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 1 0 6 7 1 5

【書類名】 特許願
【整理番号】 0112-JP01
【提出日】 平成15年10月15日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/09
C12N 15/861

【発明者】
【住所又は居所】 兵庫県神戸市東灘区御影町御影城の前 1 4 3 0 ヒースコート御影城の前
【氏名】 後藤 章暢

【発明者】
【住所又は居所】 愛媛県松山市西石井 1 - 1 - 8 西石井ハイツ 4 0 6
【氏名】 濱田 雄行

【発明者】
【住所又は居所】 兵庫県神戸市灘区篠原北町 2 丁目 8 - 5
【氏名】 白川 利朗

【特許出願人】
【識別番号】 800000057
【氏名又は名称】 財団法人新産業創造研究機構

【代理人】
【識別番号】 100115026
【弁理士】
【氏名又は名称】 圓谷 徹
【電話番号】 06-6456-0588

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 201788
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0308050

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

オンコリティックウイルスを感染させ、同ウイルスを腫瘍細胞に作用させるためのキャリアー細胞を含み、当該キャリアー細胞は以下の(1)～(4)の細胞から選ばれる、癌遺伝子治療薬。

- (1) A549細胞
- (2) 293細胞
- (3) SW626細胞
- (4) HT-IIII細胞

【請求項 2】

上記キャリアー細胞に感染させるオンコリティックウイルスは、治療対象の癌の種類等に応じて、IAI、3Bプロモーター、ミッドカインプロモーター、 β -HCGプロモーター、SCCA1プロモーター、cox-2プロモーター、PSAプロモーター、又はその他の腫瘍特異的プロモーターを有する、請求項1記載の癌遺伝子治療薬。

【請求項 3】

上記オンコリティックウイルスは、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、HIVウイルス等のレンチウイルス、レトロウイルス、レオウイルス、又はその他のオンコリティックウイルスから選ばれる、請求項1又は2記載の癌遺伝子治療薬。

【請求項 4】

キャリアー細胞投与に対する生体のCTL反応を誘導するために投与される免疫処置用ウイルスと、オンコリティックウイルスを感染させ、同ウイルスを生体の腫瘍細胞に作用させるためのキャリアー細胞とを組み合わせた癌遺伝子治療薬。

【請求項 5】

免疫処置用ウイルスおよびオンコリティックウイルスは、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、HIVウイルス等のレンチウイルス、レトロウイルス、レオウイルス、又はその他のオンコリティックウイルスから選ばれる、請求項4記載の癌遺伝子治療薬。

【請求項 6】

免疫処置用ウイルスは非増殖型のもおよび/又は不活化したものである、請求項4又は5記載の癌遺伝子治療薬。

【請求項 7】

キャリアー細胞は、A549細胞、293細胞、SW626細胞、HT-IIII細胞、PA-1細胞、又はその他のヒト由来の癌細胞もしくは正常細胞から選ばれる、請求項4～6のいずれか1項に記載の癌遺伝子治療薬。

【請求項 8】

キャリアー細胞に感染させるオンコリティックウイルスは、治療対象の癌の種類等に応じて、IAI、3Bプロモーター、ミッドカインプロモーター、 β -HCGプロモーター、SCCA1プロモーター、cox-2プロモーター、PSAプロモーター、又はその他の腫瘍特異的プロモーターを有する、請求項7記載の癌遺伝子治療薬。

【請求項 9】

キャリアー細胞投与に対する生体のCTL反応を誘導するために免疫処置用ウイルスをヒトに投与し、所定期間経過後、オンコリティックウイルスを感染させ、同ウイルスを腫瘍細胞に作用させるためのキャリアー細胞を少なくとも1回ヒトに投与することを特徴とする癌遺伝子治療方法。

【請求項 10】

免疫処置用ウイルス投与からキャリアー細胞投与までの期間を、およそ2週間以上13週間以下とする、請求項9記載の癌遺伝子治療方法。

【請求項 11】

免疫処置用ウイルスの投与量を、およそ 10^7 ウイルス粒子以上 10^{11} ウイルス粒子以下とする、請求項9記載の癌遺伝子治療方法。

【請求項 12】

キャリアー細胞によるオンコリテックウイルスの1回の投与量を、およそ 10^{11} ウイルス粒子以上 10^{13} ウイルス粒子以下とする、請求項9記載の癌遺伝子治療方法。

【請求項13】

キャリアー細胞に対するオンコリテックウイルスの感染量を、およそ5ウイルス粒子／細胞以上2000ウイルス粒子／細胞以下とする、請求項9記載の癌遺伝子治療方法。

【請求項14】

オンコリテックウイルスを用いた癌遺伝子治療方法において、鉄剤および／又はポリフィリン化合物を投与することを特徴とする癌遺伝子治療方法。

【請求項15】

鉄剤および／又は5-アミノレブリン酸 (5-aminolevulinic acid: ALA) を投与する、請求項14記載の癌遺伝子治療方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】癌遺伝子治療薬

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌遺伝子治療薬、および同治療薬を用いた癌遺伝子治療方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

近年、癌治療に関し、遺伝子治療が注目されており、これまでも様々な遺伝子治療法が提案され、臨床試験が行われている。このうち、キャリアー細胞を使用した遺伝子治療については、Freemanらによって臨床試験が行われている。この遺伝子治療は、レトロウイルスによってHSV-tk遺伝子を導入した卵巢癌細胞PA-1をキャリアー細胞に使用するものであり、卵巢癌治療、さらに悪性中皮腫治療のための臨床試験が行われている（後述の非特許文献1・2参照）。一方、Culverらは、キャリアー細胞にマウスNIH-3T3細胞を使用して脳腫瘍に対する臨床試験を行っている（後述の非特許文献3参照）。しかし、ヒトへの癌治療の適用を考慮すると、キャリアー細胞にはヒト由来細胞を使用することが要請される。

【0003】

卵巢癌細胞PA-1をキャリアー細胞に使用した遺伝子治療は、Coukosらによっても行われている（後述の非特許文献4参照）。この遺伝子治療は、腫瘍細胞において特異的に増殖するオンコリティックウイルス（oncolytic virus）を構築し、同ウイルスをキャリアー細胞（プロデューサー細胞）に感染させた後、このキャリアー細胞を腫瘍部位に投与するというものである。オンコリティックウイルスには単純ヘルペスウイルス1型（HSV-1）が用いられ、ヌードマウスの卵巢癌腹腔内播種性転移モデルに対して腹腔内投与する動物実験が行われている（後述の特許文献1・2参照）。

【0004】

しかし、上記の卵巢癌細胞PA-1は、増殖能力が高く操作しやすい細胞ではあるものの、細胞質が小さく壊れやすい。そのため、レトロウイルスによってHSV-tk遺伝子を導入しても腫瘍部位でのHSV-tk遺伝子発現は少なく、Freemanらの臨床試験では、卵巢癌および悪性中皮腫に対する十分な抗腫瘍効果は得られていない。

【0005】

オンコリティックウイルスHSV-1による癌遺伝子治療においてキャリアー細胞としてPA-1を使用した場合も、オンコリティックウイルスHSV-1の単独療法に比べて著明な抗腫瘍効果は得られていない。ウイルスによる癌遺伝子治療の問題点は、血中の中和抗体により頻回投与ができない点である。PA-1を使用した場合、細胞が脆弱でウイルス産生量も少ないため、細胞間相互作用（cell to cell interaction）により標的腫瘍細胞に感染する前に細胞が壊れてしまうこと、さらに、直接的に中和抗体によりウイルスが不活化され、抗腫瘍効果が得られないことなどが考えられる。

【0006】

また、細胞性免疫遺伝子治療の臨床試験において、患者自身の癌細胞あるいは線維芽細胞（fibroblast）をキャリアー細胞に使用することがあるが、この場合安定した細胞系が得られるまで時間がかかり、手技が困難であること、さらに遺伝子導入が個体により差があり一定でないことから安定した効果を得ることが困難であった。

【0007】

【非特許文献1】 Human Gene Therapy, 6, 927-939, 1995

【非特許文献2】 Human Gene Therapy, 9, 2641-2649, 1998

【非特許文献3】 Science, 256, 1550-1552, 1992

【非特許文献4】 Clinical Cancer Research, 5, 1523-1537, 1999

【特許文献1】 国際公開第99/45783号パンフレット

【特許文献2】 国際公開第01/23004号パンフレット

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、このような従来の問題点を解決するため、特にオンコリティックウイルスを用いた癌遺伝子治療において、強力な抗腫瘍効果が得られる新たなキャリアー細胞を見出すことを第一の課題とする。

【0009】

また、本発明の第二の課題は、さらに劇的な抗腫瘍効果が得られる新たな癌遺伝子治療法を確立すること、および、同治療法に用いる新たな癌遺伝子治療薬を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者は、上記の課題に鑑み鋭意研究を進めた結果、(1) キャリアー細胞に特定の細胞株を使用することで、従来のキャリアー細胞に比べて強力な抗腫瘍効果が得られること、さらに、(2) 予めウイルスを投与して免疫処置を施した後、オンコリティックウイルスを感染させたキャリアー細胞を投与することで、生体のCTL反応が誘導・惹起され、in vivoにおいて劇的な抗腫瘍効果が得られること、等を見出し、本発明を完成させるに至った。

【0011】

即ち、本発明の第一の癌遺伝子治療薬は、オンコリティックウイルスを感染させ、同ウイルスを腫瘍細胞に作用させるためのキャリアー細胞を含み、当該キャリアー細胞は以下の(1)～(4)の細胞から選ばれるものである。

- (1) A549細胞
- (2) 293細胞
- (3) SW626細胞
- (4) HT-111細胞

【0012】

好ましくは、上記キャリアー細胞に感染させるオンコリティックウイルスは、治療対象の癌の種類等に応じて、IAI-3Bプロモーター、ミッドカインプロモーター、 β -HCGプロモーター、SCCA1プロモーター、cox-2プロモーター、PSAプロモーター、又はその他の腫瘍特異的プロモーターを有する。その他オンコリティックウイルスは、ONYX社のE1B遺伝子欠失型のオンコリティックアデノウイルス、あるいは、UAB大学のE1A遺伝子の一部欠損型のAd5- Δ 24アデノウイルスなど、腫瘍特異的プロモーターを有しないものであってもよい。また好ましくは、上記オンコリティックウイルスは、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、HIVウイルス等のレンチウイルス、レトロウイルス、レオウイルス、又はその他のオンコリティックウイルスから選ばれる。

【0013】

本発明の第二の癌遺伝子治療薬は、キャリアー細胞投与に対する生体のCTL反応を誘導するために投与される免疫処置用ウイルスと、オンコリティックウイルスを感染させ、同ウイルスを生体の腫瘍細胞に作用させるためのキャリアー細胞とを組み合わせたものである。

【0014】

本発明の第二の癌遺伝子治療薬において、好ましくは、(1) 免疫処置用ウイルスおよびオンコリティックウイルスは、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、HIVウイルス等のレンチウイルス、レオウイルス、又はその他のオンコリティックウイルスから選ばれる、(2) 免疫処置用ウイルスは非増殖型のもおよび/又は紫外線等不活化したものである、(3) キャリアー細胞は、A549細胞、293細胞、SW626細胞、HT-111細胞、PA-1細胞、又はその他のヒト由来の癌細胞もしくは正常細胞から選ばれる、(4) キャリアー細胞に感染させるオンコリティックウイルスは、治療対象の癌の種類等に応じて、IAI-3Bプロモーター、ミッドカインプロモーター、

β -HCGプロモーター、SCCA1プロモーター、cox-2プロモーター、PSAプロモーター、又はその他の腫瘍特異的プロモーターを有する。

【0015】

本発明の癌遺伝子治療方法は、キャリアー細胞投与に対する生体のCTL反応を誘導するために免疫処置用ウイルスをヒトに投与し、所定期間経過後、オンコリティックウイルスを感染させ、同ウイルスを腫瘍細胞に作用させるためのキャリアー細胞を少なくとも1回ヒトに投与することを特徴とする。

【0016】

本発明の癌遺伝子治療方法において、好ましくは、免疫処置用ウイルス投与からキャリアー細胞投与までの期間を、およそ2週間以上13週間以下とする。また好ましくは、(1) 免疫処置用ウイルスの投与量を、およそ 10^7 ウイルス粒子以上 10^{11} ウイルス粒子以下とし、(2) キャリアー細胞によるオンコリティックウイルスの1回の投与量を、およそ 10^{11} ウイルス粒子以上 10^{13} ウイルス粒子以下とし、(3) キャリアー細胞に対するオンコリティックウイルスの感染量を、およそ5ウイルス粒子/細胞(viral particle/cell:以下、「vp/cell」という。)以上2000vp/cell以下とする。

【発明の効果】

【0017】

本発明の第一の癌遺伝子治療薬は、選別の結果、in vitroおよびin vivoの双方において高い抗腫瘍効果が認められたA549細胞などの細胞株をキャリアー細胞として用いているので、従来のキャリアー細胞に比べて強力な抗腫瘍効果を得ることができる。

【0018】

本発明の第二の癌遺伝子治療薬は、予め投与される免疫処置用ウイルスと、その後に投与されるキャリアー細胞との2種類の薬剤を組み合わせたものであり、予めアデノウイルス等のウイルス投与により免疫処置を施した後、オンコリティックウイルスを感染させたキャリアー細胞を投与することで、同ウイルスが標的腫瘍細胞に感染して直接的な抗腫瘍効果をもたらし、さらに感染標的細胞に対し生体のCTL反応が誘導され、in vivoにおいて劇的な抗腫瘍効果を得ることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

以下、本発明の実施の一形態について説明する。

〔1〕本発明の第一の癌遺伝子治療薬

本発明の第一の癌遺伝子治療薬は、オンコリティックウイルスを感染させ、同ウイルスを腫瘍細胞に作用させるためのキャリアー細胞を含み、当該キャリアー細胞は以下の(1)～(4)の細胞から選ばれる。

- (1) A549細胞
- (2) 293細胞
- (3) SW626細胞
- (4) HT-IIII細胞

【0020】

図1は、癌遺伝子治療薬に用いる効果的なキャリアー細胞を見出すために本発明者がキャリアー細胞の選別を行った結果であり、より具体的には、各種候補細胞株にオンコリティックウイルスを感染させた癌遺伝子治療薬を調製し、各々の癌細胞増殖抑制効果を調査した結果を示すグラフである。オンコリティックウイルスには、アデノウイルスAdE3-I AI. 3Bを使用した。このアデノウイルスAdE3-I AI. 3Bは、E1A遺伝子およびE3遺伝子を有し、かつ、E1A遺伝子の上流に腫瘍特異的プロモーターとして卵巣癌特異的I AI. 3Bプロモーターを有するアデノウイルスである。このアデノウイルスAdE3-I AI. 3Bを各種候補細胞株に対して500vp/cellで2日間感染させた後、各細胞を培養2日目の卵巣癌細胞HEYに添加し、培養5日目に同癌細胞HEYの増殖抑制効果を調べた。

【0021】

図1のグラフ縦軸は、各種候補細胞株について50%の増殖抑制効果(IC50)が得られる細胞数を示し、細胞数が少ない細胞株ほど増殖抑制効果が高いことになる。同図に示すように、今回調査した癌細胞株では、293細胞、A549細胞、SW626細胞、HT-I-II細胞の順に高い増殖抑制効果を示した。293細胞、A549細胞およびSW626細胞は、従来キャリアー細胞として使用されていたPA-1細胞に比べて、およそ100倍程度の高い増殖抑制効果を示した。HT-I-II細胞についても、SW626細胞と同程度の高い増殖抑制効果を示した。

【0022】

また、上記の293細胞、A549細胞、SW626細胞およびHT-I-II細胞にオンコリティックアデノウイルスを感染させた癌遺伝子治療薬を調製し、各治療薬について、充分量の抗アデノウイルス中和抗体存在下(Ab(+))における、癌細胞増殖抑制効果を検討した。その結果、図4に示すように、抗体存在下であっても、上記4種の細胞をキャリアー細胞に用いた癌遺伝子治療薬はいずれも強い癌細胞増殖抑制効果を示した。従来、ウイルスによる癌遺伝子治療は、抗体産生により頻回投与ができないことが難点とされていたが、上記4種の細胞をキャリアー細胞に用いた場合は、抗体存在下にもかかわらずin vitroにおいて強力な増殖抑制効果が得られた。

【0023】

さらに、ヌードマウス皮下腫瘍モデルを用いたin vivoの実験においても、上記のA549細胞、293細胞およびSW626細胞をキャリアー細胞に用いた場合は、強力な抗腫瘍効果を示した(図5および図6参照)。なお、これら実験の詳細は後述の実施例において説明する。

【0024】

このように、オンコリティックウイルスをキャリアー細胞に感染させて得られる癌遺伝子治療薬において、キャリアー細胞にA549細胞、293細胞、SW626細胞、HT-I-II細胞のいずれかを使用することで高い抗腫瘍効果を得ることができる。

【0025】

上記4種の細胞について説明すると、A549細胞は、小細胞性肺癌細胞株であり、その詳細については例えば論文Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., and Parks, W.P. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors, J. Natl. Cancer Inst., 51: 1417-1423, 1973.などに記載されている。293細胞は、ヒト胎児腎由来細胞であり、アデノウイルス産生細胞として試験研究に多く用いられている細胞株である。293細胞については例えば論文Xie QW, et al. Complementation analysis of mutants of nitric oxide synthase reveals that the active site requires two hemes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 4891-4896, 1996.などに説明がある。SW626細胞は、大腸癌卵巣転移株であり、その詳細については例えば論文Fogh J, et al. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. J. Natl. Cancer Inst. 58: 209-214, 1977.などに記載されている。HT-I-II細胞は、子宮頸部扁平上皮癌細胞であり、その詳細については例えば論文Fogh J, et al. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. J. Natl. Cancer Inst. 58: 209-214, 1977.などに記載されている。これら4種の細胞株はいずれもATCC (American Type Culture Collection)等の細胞保存機関から入手可能であり、その他、市販されているものを使用してもよい。

【0026】

本発明の癌遺伝子治療薬において、上記キャリアー細胞に感染させるオンコリティックウイルスとしては、従来遺伝子導入に用いられるウイルスベクターを使用することができ、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)、単純ヘルペスウイルス2型(HSV-2)、HIVウイルス(エイズウイルス)等のレンチウイルスやマウス白血病ウイルス等のレトロウイルス、レオウイルスなどが例示され、さらにその他のオンコリティックウイルスであってもよい。オンコリティックウイルスは、

増殖型ウイルスベクターであって標的の腫瘍細胞または腫瘍組織において特異的に増殖するようウイルス遺伝子を改変し、標的細胞を融解・殺傷するcell lysis作用を有するものであればよく、例えばアデノウイルスの場合、その増殖に必要なE1AまたはE1B領域を有するものであればよい。

【0027】

本発明の癌遺伝子治療薬は、ほぼ全ての悪性腫瘍に適用することができ、治療対象となる癌の種類は、卵巣癌、扁平上皮癌（子宮頸部癌、皮膚癌、頭頸部癌、食道癌、肺癌等）、消化器癌（大腸癌、膵癌、肝癌、胃癌等）、神経芽細胞腫、脳腫瘍、乳癌、精巣癌、前立腺癌などが例示される。また、アデノウイルス34,35型など血液細胞にも感染可能なウイルスを使用することで、本発明の癌遺伝子治療薬は血液性悪性腫瘍にも適用可能である。

【0028】

治療対象となる癌の種類に応じて、オンコリティックウイルスに導入する腫瘍特異的プロモーターの種類を選択するとよい。例えば、卵巣癌に対してはIAI-3Bプロモーター、脳腫瘍、悪性グリオーマなどに対してはミッドカインプロモーター、精巣癌に対しては β -HCGプロモーター、扁平上皮癌に対してはSCCA1プロモーターおよびSCCA2プロモーター、大腸癌に対してはCEAプロモーター、前立腺癌に対してはPSAプロモーター、肝癌に対してはAFPプロモーター、を使用することができる。勿論、他の公知の腫瘍特異的プロモーター、例えば、種々の悪性腫瘍に対してプロモーター活性を発揮し、広い作用スペクトラムを有するcox-2プロモーターや、その他オステオカルシンプロモーター等の各種癌特異性プロモーターを使用してもよい。上記ミッドカインプロモーターについては、脳腫瘍、悪性グリオーマのほか種々の悪性腫瘍に対して使用可能であり、この点においてcox-2プロモーターと同様に広い作用スペクトラムを有する。

【0029】

使用する各プロモーター配列の長さ等については、腫瘍特異的プロモーター活性が得られる限りにおいて特に限定されるものではない。上記IAI-3Bプロモーターは、国際公開第03/025190号パンフレットおよび文献Cancer Research 63, 2506-2512, 2003の記載にしたがって設計・調製し、ウイルスゲノムに挿入することができる。上記のミッドカインプロモーター、 β -HCGプロモーター、SCCA1プロモーターについては、それぞれ、国際公開第02/10368号パンフレット、国際公開第01/90344号パンフレット、国際公開第00/60068号パンフレットの記載にしたがって設計・調製し、ウイルスゲノムに挿入することができる。

【0030】

上記SCCA1プロモーターについては、論文Biochimica et Biophysica Acta 91522 (2001) 1-8, Molecular cloning of human squamous cell carcinoma antigen 1 gene and characterization of its promoter, Katsuyuki Hamada, Hiroto Shinomiya, Yoshihiro Asano, Toshimasa Kihana, Mari Iwamoto, Yasushi Hanakawa, Koji Hashimoto, Susumu Hirose, Satoru Kyo, Masaharu Itoにも詳細な説明がなされている。

【0031】

例えば、オンコリティックアデノウイルスを作製する場合、アデノウイルスの増殖に必要な遺伝子である初期遺伝子E1AまたはE1Bの上流に腫瘍特異的プロモーターを挿入するか、あるいは、初期遺伝子E1AまたはE1Bプロモーターと置換することにより構築することができる。HSV-1、HSV-2、レトロウイルス、レオウイルスなど、アデノウイルス以外のウイルスを使用する場合も、同様に、ウイルスの増殖に必要な遺伝子の上流に腫瘍特異的プロモーターを挿入するか、あるいは、当該遺伝子のプロモーターと置換することにより構築することができる。

【0032】

もっとも、オンコリティックウイルスは、標的の腫瘍細胞または腫瘍組織において特異的に増殖する性質を有する限り、必ずしも腫瘍特異的プロモーターを有するものでなくてもよい。例えば、ONYX社のE1B遺伝子欠失型のオンコリティックアデノウイルス、

あるいは、UAB大学のE1A遺伝子の一部欠損型のAd5- Δ 24アデノウイルスなど、腫瘍特異的プロモーターを有しないオンコリテックウイルスを使用することも可能である。

【0033】

オンコリテックウイルスをキャリアー細胞に感染させる方法は、常法に従って行えばよく特に限定されるものではないが、例えばキャリアー細胞をディッシュに播き、これにオンコリテックウイルスをすべての細胞に感染可能な量添加し、95%O₂、5%CO₂、37℃、牛胎児血清FCS(-)、RPMI培地の条件下で6時間から36時間程度培養し感染させる方法が簡便である。後述の実施例においては、A549細胞、SW626細胞、HT-II-II細胞はこの方法で培養し、オンコリテックウイルスを感染させたが、293細胞に関してはFCS(+)10%、DMEM培地の条件下で培養し、オンコリテックウイルスを感染させた。なお、牛胎児血清FCSは、6-12時間感染の場合はFCS(-)の条件で、それ以上の時間感染させる場合は6-12時間FCS(-)の状態におき、後にFCS10%を加えるとよい。

【0034】

キャリアー細胞に対するオンコリテックウイルスの感染量および感染時間は、治療対象の腫瘍の大きさ・種類、キャリアー細胞の種類・投与量、使用するオンコリテックウイルスの種類、本遺伝子治療薬の投与方法などに応じて最適な量と時間を選択すればよい。特に限定されないが、一例として、キャリアー細胞にA549細胞を使用した場合、腹腔内投与では約5-250vp/cellでおよそ6-24時間、腫瘍内投与では約5-50vp/cellでおよそ12-24時間、SW626細胞の場合、腹腔内投与では約250-2000vp/cellでおよそ6-24時間、腫瘍内投与では約100-250vp/cellでおよそ12-24時間、293細胞の場合、腫瘍内投与では約5-50vp/cellでおよそ6-24時間、に設定することができる。このようにキャリアー細胞の種類、投与方法に応じて感染量・感染時間も異なるが、上記の例では腹腔内投与のときは約5-2000vp/cellでおよそ6-24時間、腫瘍内投与のときは約5-250vp/cellでおよそ12-24時間、の範囲でそれぞれ感染量・感染時間を設定することができる。

【0035】

キャリアー細胞にオンコリテックウイルスを感染させ、本発明の癌遺伝子治療薬を調製する場合、使用時まではオンコリテックウイルスを感染させない状態でキャリアー細胞を保存しておくことが好ましい。キャリアー細胞の保存は、例えば液体窒素中あるいは-150℃程度の温度にて保存することができる。一方、オンコリテックウイルスは、例えば-80℃程度の温度にて保存することができる。

【0036】

使用時には、前記の方法によりオンコリテックウイルスをキャリアー細胞に感染させ、得られたウイルス感染キャリアー細胞を、これをそのまま、あるいは慣用の医薬製剤担体とともに本発明の癌遺伝子治療薬となし、ヒト（またはマウス、ラット等の実験動物）に投与することができる。なお、キャリアー細胞は、ウイルス感染前または感染後に放射線照射することが好ましい。後述の実施例では、キャリアー細胞にA549細胞、SW626細胞、HT-II-II細胞を使用した場合、これらの細胞をヌードマウスに投与する前にそれぞれ60-80Gy、20-40Gy、20-40Gyにて放射線照射を行った。

【0037】

本発明の癌遺伝子治療薬は、非経口剤として投与することが好ましく、in vivo法、ex vivo法のいずれであってもよい。in vivo法の場合、腫瘍の大きさ・種類、症状の程度、患者の年齢、体重などに応じて用量（換言すれば、ウイルス感染キャリアー細胞の投与量）を調節し、例えば、静注、点滴静注、腫瘍内注射、腹腔注射のような腔内注射などによって投与する。このような注射剤は常法に従って製造され、希釈剤として一般に生理食塩水、細胞培養液等を用いることができる。さらに必要に応じて、殺菌剤、防腐剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤などを加えてもよい。これら製剤中のウイルス感染キャリアー細胞の配合量は特に限定されるものではなく任意に設定できる。

【0038】

勿論、本発明の癌遺伝子治療薬は、数回にわたり患者に投与してもよいし、複数回のクールに分け、一クール当たりの投与回数、投与間隔などを任意に設定してもよい。

【0039】

上記のように、ウイルス感染キャリアー細胞の投与量は、腫瘍の大きさ・種類、症状の程度、患者の年齢、体重などに応じて決定すればよいが、通常の場合、1回のキャリアー細胞の投与量をおよそ 10^7 細胞数以上 10^9 細胞数以下に、キャリアー細胞によるオンコリティックウイルスの1回の投与量をおよそ 10^{11} ウイルス粒子以上 10^{13} ウイルス粒子以下に設定することができる。

【0040】

キャリアー細胞の種類も治療対象の癌の種類などに応じて適宜選択することができる。また、遺伝子組換え技術によってキャリアー細胞を改変し、例えば標的腫瘍細胞と結合しやすくなるようキャリアー細胞の細胞表面に人為的に特定タンパク質等を発現させてもよいし、キャリアー細胞にセンダイウイルスを感染させる等の処置を行ってもよい。

【0041】

さらに、治療対象の癌におけるウイルス産生量を高めるために、鉄剤の投与および／又はポルフィリン化合物の投与を行ってもよい。ポルフィリン化合物としては、5-アミノレブリン酸 (5-aminolevulinic acid: ALA)、ヘマトポルフィリン (hematoporphyrin)、フォトフィリン (photofrin) 等が例示される。鉄剤としては、経口剤として硫酸第一鉄 (FeSO_4)、クエン酸第一鉄、静注用鉄剤としてコンドロイチン硫酸鉄、含糖酸化鉄が例示される。投与方法は特に限定されるものではないが、本発明の癌遺伝子治療薬とともに、注射剤あるいは経口剤として投与することが好ましい。

【0042】

実際に、鉄剤 (Fe) および／又は5-アミノレブリン酸 (ALA) を投与することにより、オンコリティックアデノウイルスAdE3-IAI.3Bの癌細胞増殖抑制効果を著しく亢進することができた (後述の実施例5参照)。

【0043】

オンコリティックウイルスは、細胞間相互作用 (cell to cell interaction) によりキャリアー細胞から標的腫瘍細胞へと感染し、腫瘍細胞内で特異的に増殖し、腫瘍細胞を融解・殺傷するcell lysis作用を発揮することができる。ウイルスによる癌遺伝子治療は、抗体産生により頻回投与ができないことが難点とされていたが、キャリアー細胞を用いると細胞間相互作用により標的腫瘍細胞に直接的に感染が成立することによって頻回投与が可能となり、強力な抗腫瘍効果が期待できる。

【0044】

〔2〕本発明の第二の癌遺伝子治療薬

本発明の第二の癌遺伝子治療薬は、キャリアー細胞投与に対する生体のCTL反応を誘導するために投与される免疫処置用ウイルスと、オンコリティックウイルスを感染させ、同ウイルスを生体の腫瘍細胞に作用させるためのキャリアー細胞とを組み合わせたもの、つまり、予め投与される免疫処置用ウイルスと、その後に投与されるキャリアー細胞との2種類の薬剤を組み合わせたものであり、予めアデノウイルス等のウイルス投与により免疫処置を施した後、オンコリティックウイルスを感染させたキャリアー細胞を投与することで、生体のCTL反応が誘導・惹起され、in vivoにおいて劇的な抗腫瘍効果を得ることができる。

【0045】

実際に免疫機能が正常なsyngenicモデルマウスを使った実験において、本発明の癌遺伝子治療薬は劇的な抗腫瘍効果を示した。詳細は後述するが、(C57Black+C3H/He) F1マウスに卵巣癌細胞OVHMを皮下移植し、その後、卵巣癌特異のプロモーターを導入したオンコリティックアデノウイルスを感染させたキャリアー細胞 (A549細胞) を局所注射したところ、3ヶ月前に予めアデノウイルスにより免疫処置を施したマウスでは、投与開始後3-4日で明らかな抗腫瘍効果を示し、9日後に腫瘍は完全に消失し、リンパ節転移も消失した (図7参照)。

【0046】

このように、抗体産生があるにもかかわらずむしろ免疫力のあるマウスでより強力かつ劇的な抗腫瘍効果が得られたのは、免疫処置用アデノウイルスの投与によって生体のCTL反応（細胞障害性T細胞を介した細胞障害活性）が誘導・惹起されたためと考えられる。つまり、従来のウイルスによる癌遺伝子治療は、抗体産生により頻回投与ができないことが難点とされていたが、本発明の癌遺伝子治療薬は、生体の免疫機構を利用してウイルスが感染した標的腫瘍細胞を攻撃させることにより、むしろこれを武器に変えるものといえる。

【0047】

免疫処置用ウイルスとオンコリティックウイルスとは同種類のものを使用することが好ましい。免疫処置用ウイルスには非増殖型のものおよび／又は不活化したものを使用することが好ましく、非増殖型のもを更に紫外線照射等によりDNAを破壊し不活化したものがより好ましい。例えば、免疫処置用ウイルスにアデノウイルスを使用する場合は、E1領域が欠失したもののおよび／又は紫外線照射によりDNAを破壊し不活化したものを使用するとよい。

【0048】

オンコリティックウイルスの種類、キャリアー細胞の種類、感染方法などは、前述した本発明の第一の癌遺伝子治療薬の場合と同様である。ただし、キャリアー細胞は、前記4種の細胞（即ち、A549細胞、293細胞、SW626細胞、HT-I-II細胞）を使用することが好ましいが、これに限定されるものではなく、他の細胞、例えば、PA-1細胞（特にヘルペスウイルスをオンコリティックウイルスに使用する場合等）、繊維芽細胞（fibroblast）、その他のヒト由来の癌細胞あるいは正常細胞、患者由来の癌細胞などをキャリアー細胞に使用してもよい。

【0049】

オンコリティックウイルスのウイルス遺伝子に導入される腫瘍特異的プロモーターについても、癌の種類などに応じて前記プロモーター（即ち、IAI-3Bプロモーター、ミッドカインプロモーター、 β -HCGプロモーター、SCCA1プロモーター、cox-2プロモーター、PSAプロモーター、CEAプロモーターなど）を使用することが好ましいが、これに限定されるものではない。またオンコリティックウイルスは、ONYX社のE1B遺伝子欠失型のオンコリティックアデノウイルス、あるいは、UAB大学のE1A遺伝子の一部欠損型のAd5- Δ 24アデノウイルスなど、腫瘍特異的プロモーターを有しないものであってもよい。

【0050】

本発明の癌遺伝子治療薬において、免疫処置用ウイルスの投与量、ウイルス感染キャリアー細胞の投与量などは、患者のウイルスに対する抗体価、腫瘍の大きさ・種類、症状の程度、患者の年齢、体重などに応じて適宜選択すればよい。通常の場合、例えば免疫処置用ウイルス1回の投与量を、およそ 10^8 ウイルス粒子以上 10^{11} ウイルス粒子以下に設定することができる。また、免疫処置用ウイルス投与からキャリアー細胞投与までの期間をおよそ2週間以上3ヶ月以下に、キャリアー細胞によるオンコリティックウイルスの1回の投与量をおよそ 10^{11} ウイルス粒子以上 10^{13} ウイルス粒子以下に、キャリアー細胞に対するオンコリティックウイルスの感染量を、およそ5 vp/cell以上2000 vp/cell以下に設定することができる。

【0051】

勿論、本発明の第一の癌遺伝子治療薬と同様に、ウイルス感染キャリアー細胞は数回にわたり患者に投与してもよいし、複数回のクールに分け、一クール当たりの投与回数、投与間隔などを任意に設定してもよい。

【0052】

本発明の第二の癌遺伝子治療薬の具体例としては、（1）免疫処置用ウイルスとキャリアー細胞とを組み合わせたもの、（2）さらに、キャリアー細胞に感染させるオンコリティックウイルスを組み合わせたもの、（3）上記（1）又は（2）の組み合わせに、さら

に、ウイルス産生量を高めるための鉄剤および／又はポルフィリン化合物を組み合わせたもの、(4) 上記(1)～(3)の組み合わせに、保存、感染・培養、医薬製剤の調製などに必要な化合物(試薬、緩衝液、酵素等)、または容器(反应用、感染・培養用、保存用等)などを組み合わせたもの、を挙げることができる。

【0053】

同様に、前述の本発明の第一の癌遺伝子治療薬の具体例としては、(1) 特定のキャリアー細胞、(2) さらに、キャリアー細胞に感染させるオンコリティックウイルスを組み合わせたもの、(3) 上記(1)又は(2)の組み合わせに、さらに、ウイルス産生量を高めるための鉄剤および／又はポルフィリン化合物を組み合わせたもの、(4) 上記(1)～(3)の組み合わせに、保存、感染・培養、医薬製剤の調製などに必要な化合物(試薬、緩衝液、酵素等)、または容器(反应用、感染・培養用、保存用等)などを組み合わせたもの、を挙げることができる。

【実施例】

【0054】

以下、図面を参照しながら本発明の実施例について説明するが、本発明はこれら実施例によって何ら限定されるものではない。

【0055】

〔実施例1：キャリアー細胞の選別と、抗体存在下における抗腫瘍効果〕

既存の癌細胞株のうち、キャリアー細胞として強力な癌細胞増殖抑制効果を発揮する細胞株を選別するため、以下の実験を行った。

【0056】

キャリアー細胞に感染させるオンコリティックウイルスには、アデノウイルスAdE3-I A I. 3 Bを使用した。このアデノウイルスAdE3-I A I. 3 Bは、E1 A遺伝子およびE3遺伝子を有し、かつ、E1 A遺伝子の上流に腫瘍特異的プロモーターとして卵巣癌特異的I A I. 3 Bプロモーターを有するアデノウイルスである。このアデノウイルスAdE3-I A I. 3 Bを種々のキャリアー細胞に対し500 vp/cellで2日間感染させた後、同キャリアー細胞を培養2日目の卵巣癌細胞株HEYに加え、培養5日目に同細胞株HEYのin vitro増殖抑制効果を調査した。

【0057】

上記実験結果を図1に示す。同図グラフの縦軸は、各細胞株について50%の増殖抑制効果(IC50)が得られる細胞数を示し、細胞数が少ない細胞株ほど増殖抑制効果が高いことになる。同図に示すように、今回調査した癌細胞株では、293細胞、A549細胞、SW626細胞、HT-I I I細胞の順に高い抗腫瘍効果を示した。293細胞、A549細胞およびSW626細胞は、従来キャリアー細胞として使用されていたPA-1細胞に比べて、およそ100倍程度の高い増殖抑制効果を示した。HT-I I I細胞についても、SW626細胞と同程度の高い増殖抑制効果を示した。

【0058】

次に、オンコリティックウイルス単独の場合とキャリアー細胞を用いた場合とで、ウイルス抗体存在下、増殖抑制効果がどのように変化するかを調べた。キャリアー細胞には293細胞を用い、この293細胞に上記アデノウイルスAdE3-I A I. 3 Bを2日間感染させ、得られたアデノウイルスAdE3-I A I. 3 B感染293細胞およびその細胞上清(AdE3-IAI3B 293 cell+SUPT)を、抗アデノウイルス抗体存在下、12ウェルプレートに投与した。各ウェルには前日に5万個程度の卵巣癌細胞株HEYがまき込まれている。抗アデノウイルス抗体には、600倍の抗体価を有するものを様々な抗体価に希釈して用いた。同様に、オンコリティックウイルス単独の場合として、アデノウイルスAdE3-I A I. 3 Bを、抗アデノウイルス抗体存在下、1ウェル1000 vp/cellで12ウェルプレートに投与した。そして、それぞれの場合において培養5日目に癌細胞(HEY細胞)の増殖抑制効果を調べた。

【0059】

上記実験結果を図2に示す。同図グラフの縦軸は、50%の増殖抑制効果(IC50)

が得られるときの抗アデノウイルス抗体の希釈度を示す。つまり、293細胞を用いた場合は、5倍程度の希釈（120倍の抗体価）でも50%の増殖抑制効果が得られ、アデノウイルス単独の場合は、600倍程度の希釈（1倍の抗体価）によって50%の増殖抑制効果が得られた。このように、キャリアー細胞を用いた場合は、抗体価の高い条件下においても増殖抑制効果を発揮することが示された。

【0060】

同様に、抗アデノウイルス抗体存在下、HEY細胞に対する増殖抑制効果を、(1)アデノウイルス感染293細胞の上清と細胞成分 (AdE3-IAI3B 293 cell+SUPT)、(2)アデノウイルスを含む細胞上清 (AdE3-IAI3B, SUPT)、(3)アデノウイルスを含む細胞上清を0.2 μ mのフィルターで処理したもの (AdE3-IAI3B, SUPT, filter)、(4)アデノウイルス単独 (AdE3-IAI3B)、のそれぞれの場合について調べた。その結果を図3に示す。同図グラフの縦軸は、50%の増殖抑制効果 (IC50) が得られるときの抗アデノウイルス抗体の希釈度を示す。同図に示すように、キャリアー細胞 (293細胞) を用いた場合に、他の場合と比べてより強力な抗腫瘍効果が得られた。

【0061】

さらに上記と同様の実験で、293細胞、A549細胞、SW626細胞、HT-I I細胞の各キャリアー細胞について、100 μ l/wellの抗アデノウイルス抗体存在下 (Ab (+))、または非存在下 (Ab (-)) における、癌細胞株HEY細胞に対する増殖抑制効果を検討した。その結果を図4に示す。同図グラフの縦軸は、培養5日目の癌細胞数を示す。同図に示すように、上記4種類の細胞のうち、A549細胞をキャリアー細胞に用いた場合に最も強力な増殖抑制効果を示した。即ち、充分量の抗アデノウイルス中和抗体存在下にアデノウイルス感染A549細胞を投与すると、標的癌細胞の増殖は抗体存在下にもかかわらずほぼ完全に抑制された。他の3種類の細胞についても、抗体存在下、充分な増殖抑制効果が得られた。

【0062】

ウイルスによる癌遺伝子治療は、抗体産生により頻回投与ができないことが難点とされていたが、キャリアー細胞を用いることで、細胞間相互作用により標的癌細胞に直接的に感染が成立することによって、頻回投与が可能となる。さらに、キャリアー細胞として上記4種類の細胞を用いることで、強力な抗腫瘍効果を得ることができる。

【0063】

〔実施例2：ヌードマウス皮下腫瘍モデルにおけるin vivo抗腫瘍効果〕

次に、ヌードマウス皮下腫瘍モデルを用いて本発明の癌遺伝子治療薬のin vivo抗腫瘍効果を検討した。実験では、生後5週のヌードマウスの皮下にヒト卵巣癌細胞RMG-1を移植し、4週間後、直径約10-15mmになった巨大腫瘍に対し、本発明の癌遺伝子治療薬を6回腫瘍内注射し、腫瘍体積の変化を観察した。その結果を図5のグラフに示す。グラフ中、黒四角印の「control」はPBS緩衝液を6回腫瘍内注射した結果、黒丸印の「AdE3-IAI.3B」は上記アデノウイルスAdE3-IAI.3Bをマウス1匹に 1×10^{10} ウイルス粒子投与した結果、黒三角印はアデノウイルスAdE3-IAI.3Bを250 vp/cell感染させたSW626細胞をマウス1匹に 1×10^7 個投与した結果、黒菱形印はアデノウイルスAdE3-IAI.3Bを25 vp/cell感染させた293細胞をマウス1匹に 1×10^7 個投与した結果、白四角印はアデノウイルスAdE3-IAI.3Bを50 vp/cell感染させたA549細胞をマウス1匹に 1×10^7 個投与した結果、でBを50 vp/cell感染させたA549細胞をマウス1匹に 1×10^7 個投与した結果、である。同図に示すように、293細胞およびA549細胞をキャリアー細胞に用いた場合は、投与後50日経過すると、直径約10-15mmの巨大腫瘍が完全に消退した。SW626細胞は、98%の増殖抑制効果を示した。

【0064】

上記と同様の実験を、生後5週のヌードマウスの皮下にヒト卵巣癌細胞PA-1を移植して行った。その結果を図6に示す。同図に示すように、293細胞およびA549細胞をキャリアー細胞に用いると、直径約10-15mmの巨大腫瘍が完全に消退した。SW626細胞は、5匹中4匹のマウスにおいて腫瘍が完全に消失した。

【0065】

〔実施例3：免疫力のある皮下腫瘍モデルマウスにおけるin vivo抗腫瘍効果〕

次に、免疫機能が正常な (C57black×C3H/He) F1マウスを用いて本発明の癌遺伝子治療薬のin vivo抗腫瘍効果を検討した。本実験では、(1) syngenicモデルマウスに対し同種の卵巣癌細胞OVHMを皮下移植し、その10日後以降、上記アデノウイルスAdE3-I A I. 3Bを50vp/cell感染させた放射線治療後のA549細胞を5回腫瘍内投与した場合、(2) 生後7週のsyngenicモデルマウスを免疫処置用ウイルスであるアデノウイルス投与により予め免疫し、その3ヶ月後、上記(1)の場合と同様に、卵巣癌細胞OVHMを皮下移植し、その10日後以降、上記アデノウイルスAdE3-I A I. 3Bを50vp/cell感染させた放射線治療後のA549細胞を5回腫瘍内投与した場合、(3) コントロールとしてPBS緩衝液を5回腫瘍内投与した場合、のそれぞれの場合について抗腫瘍効果を検討した。

【0066】

上記実験結果を図7のグラフに示す。グラフ中、黒四角印の「control」は上記(3)のコントロールの場合の結果であり、黒丸印の「Ad(-)→A549」は上記(1)の免疫処置用アデノウイルスを投与しなかった場合の結果であり、黒三角印の「Ad(+)→A549」は上記(2)の免疫処置用アデノウイルスを投与した場合の結果である。なお、免疫処置用アデノウイルスには、E1遺伝子を有しない非増殖型のアデノウイルスを使用し、より具体的には、CMVプロモーターの下流にlacZ遺伝子が挿入されたアデノウイルスを使用した。同図に示すように、予めアデノウイルスによる免疫をしていない上記(1)の場合では、コントロールに比べて20%の抗腫瘍効果を示したのに対し、予めアデノウイルスによる免疫処置を施した上記(2)の場合では、投与開始後3-4日で明らかな抗腫瘍効果を示し、9日後に腫瘍は完全に消失し、リンパ節転移も消失した。このように、抗体産生があるにも関わらずむしろ免疫力のあるマウスでより強力かつ劇的な抗腫瘍効果が得られたのは、免疫処置用アデノウイルスの投与によって生体のCTL反応が誘導・惹起されたためと考えられる。

【0067】

オンコリティックアデノウイルスは、細胞間相互作用によりキャリアー細胞から標的腫瘍細胞へと感染し、腫瘍細胞内で特異的に増殖し、腫瘍細胞を融解・殺傷するcell lysis作用を発揮すると考えられるが、本発明の癌遺伝子治療薬においては、予め免疫処置用アデノウイルスを投与することによって、オンコリティックアデノウイルスに感染した標的腫瘍細胞を排除する生体の強いCTL反応が誘導され、アデノウイルス感染腫瘍細胞の完全な自然排除が誘導されることが考えられる。

【0068】

標的腫瘍細胞へのアデノウイルスの感染方法の1つとして、アデノウイルスによる細胞融合が考えられる。図8は、A549細胞をまき込んだウェルに、紫外線照射により不活化したアデノウイルスを1細胞当たり10000ウイルス粒子投与し、一晚培養後、顕微鏡により観察した結果を示すものである。同図矢印に示すように、アデノウイルスの投与によって細胞融合が起こり、多核細胞が散見された。アデノウイルスを投与しなかったA549細胞では、このような変化は観察されなかった(図9参照)。

【0069】

細胞融合以外に考えられる感染方法としては、キャリアー細胞の標的細胞への細胞接着さらに局所的なアデノウイルスのバーストあるいはアデノウイルスを含むキャリアー細胞fragmentによる標的腫瘍細胞へのアデノウイルスの感染が成立すると考えられる。何れの方法にせよ、アデノウイルスに感染した標的腫瘍細胞においては、腫瘍特異的プロモーターを有するアデノウイルスが増加し強力な免疫原となって(あるいはアデノウイルスに感染した標的腫瘍細胞が有する癌特異的ペプチドを二次的に抗原認識することによって)、CTL反応により腫瘍細胞が排除されることが考えられる。

【0070】

〔実施例4：ミッドカインプロモーターを使用した場合の抗腫瘍効果〕

次に、ミッドカインプロモーターを使用した場合の抗腫瘍効果を検討した。図10 (a) は、1~21のヒト手術標本におけるミッドカイン (MK) mRNAの発現をRT-PCRで検討した結果である。同図に示すように、神経膠芽腫 (glioblastoma)、未分化星細胞腫 (anaplastic astrocytoma) といった悪性グリオーマ (malignant glioma) および弥漫性星細胞腫 (diffuse astrocytoma) においてミッドカインmRNAの過剰発現が認められた。このように、ミッドカインは脳腫瘍など多くの癌において過剰発現が認められる。

【0071】

図10 (b) は、上記と同様の方法により、悪性グリオーマの4つの細胞株におけるミッドカインmRNAの発現をRT-PCRで検討した結果である。同図に示すように、4つの細胞株のうち、U87MGでは発現はなく、U251MG、LN319、U373MGではミッドカインmRNAの過剰発現が認められた。

【0072】

図10 (c) は、上記各細胞株におけるミッドカイン蛋白の発現をウエスタンブロット解析によって検討した結果であり、mRNAと同様にU87MGでは発現はなく、U251MG、LN319、U373MGではミッドカイン蛋白の過剰発現が認められた。

【0073】

次に、ミッドカインのプロモーターアッセイを行った。実験では、長さが異なる2つのミッドカインプロモーター (600塩基と2300塩基) の活性を比較した。それぞれのプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子が挿入されたプラスミド (pGL3-MK600およびpGL3-MK2300) を上記各細胞株に導入し、それぞれのルシフェラーゼ活性を調べることによりプロモーター活性を評価した。その結果、図11に示すように、悪性グリオーマの細胞株では、長さ600塩基のほうが長さ2300塩基より高いプロモーター活性を示した。

【0074】

図12 (a) は、今回設計した、ミッドカインプロモーターを有するオンコリテック (細胞融解型) アデノウイルスの構造を模式的に示す図である。長さ600塩基または2300塩基のミッドカインプロモーターは、552bpの位置に導入された。

【0075】

図12 (b) は、3種類のアデノウイルスを上記各細胞株に感染させ、それぞれの細胞株におけるE1A蛋白の発現をウエスタンブロット解析によって検討した結果である。同図に示すように、長さ600塩基のミッドカインプロモーターを有するアデノウイルス (AdMK600) を感染させた場合、ミッドカインを発現するU251MG、LN319、U373MGでのみアデノウイルスのE1A蛋白の発現が観察された。これに対して、野生型のアデノウイルス (AdWild) では正常脳細胞を含めすべての細胞にE1A蛋白の発現が観察され、コントロールウイルスであるAdLacZではいずれの細胞においてもE1A蛋白の発現が観察されなかった。

【0076】

図13 (a) は、3種類のアデノウイルスによる癌細胞増殖抑制効果を比較検討した結果である。野生型のアデノウイルス (AdWild) ではすべての細胞において強い増殖抑制効果を示したが、ミッドカインプロモーターを有するアデノウイルス (AdMK600およびAdMK2300) では、ミッドカインを発現するU251MG、LN319、U373MGにおいてのみ増殖抑制効果を示し、これらの値は、ミッドカインmRNAの発現量、プロモーター活性とよく相関した。また、長さ2300塩基のミッドカインプロモーターを有するアデノウイルスAdMK2300よりAdMK600のほうが強い増殖抑制効果を示した。

【0077】

図13 (b) は、アデノウイルスのE3領域の増殖抑制効果に与える影響を検討した結果であり、同図に示すように、E3領域のあるAdMK600ではE3領域のないアデノウイルス (AdMK600-ΔE3) より10倍程度の強い増殖抑制効果を示した。

【0078】

図13(c)は、ヌードマウス皮下移植モデルにおけるアデノウイルスの抗腫瘍効果を検討した結果である。図中、黒菱形印は野生型のアデノウイルスAdWildを投与した結果、黒四角印はミッドカインプロモーターを有するアデノウイルスAdMK600を投与した結果、黒三角印はLacZ遺伝子が挿入されたアデノウイルスAdLacZを投与した結果、黒丸印はPBS緩衝液のみ投与した結果である。同図に示すように、ミッドカインを発現しないU87MGでは野生型のアデノウイルスのみ抗腫瘍効果を示し、ミッドカインを発現するU373MGではAdMK600とAdWildは完全に腫瘍の消失をもたらした。PBS緩衝液のみ注射したコントロールとAdLacZを注射したものとの間には大きな差異は認められなかった。

【0079】

さらに、上記ミッドカインプロモーターを有するアデノウイルス(Ad-MK600)をキャリアー細胞に感染させ本発明の癌遺伝子治療薬を調製し、その抗腫瘍効果をAd-MK600単独投与の場合と比較した。実験では、293細胞およびA549細胞をキャリアー細胞に使用した。ヌードマウス5週令に上記U373MG細胞を移植し、3週間後に10-15mmの腫瘍が得られた後、本発明の癌遺伝子治療薬またはAd-MK600のみを投与し、その4週間後に腫瘍体積の大きさを比較した。その結果を図14に示す。図中、「Ad-MK600」はAd-MK600を単独投与した結果、「293」「A549」はそれぞれ293細胞、A549細胞をキャリアー細胞に用いた本発明の癌遺伝子治療薬を投与した結果である。同図に示すように、本発明の癌遺伝子治療薬を投与したときは完全に腫瘍が消失した。一方、Ad-MK600を単独投与したときはコントロール(control)と殆ど差は認められなかった。

【0080】

〔実施例5：アデノウイルスAdE3-IAI.3Bの増殖抑制効果に対するFeおよびALAの影響〕

卵巣癌細胞HEYを12well dishに10000/well播いた後、翌日にFeSO₄を50μg/ml、5μg/ml、0.5μg/ml、0μg/mlの各濃度において入れ、全てのwellに細胞障害型アデノウイルスAdE3-IAI.3Bを入れ、5日後にアデノウイルスの増殖抑制効果をIC50で評価した。その結果を図15に示す。図中縦軸は、各場合におけるIC50のウイルス投与量(vp/cell)を相対的に示すものである。同図に示すように、FeSO₄ 50μg/mlおよびアデノウイルスを併用した場合は、アデノウイルス単独に比べ約20倍、FeSO₄ 5μg/mlおよびアデノウイルス併用では、アデノウイルス単独に比べ約8倍の増殖抑制効果を示した。

【0081】

次に、卵巣癌細胞株HEYを12well dishに10000/well播いた後、翌日に5-aminolevulinic acid(ALA)を50μg/ml、5μg/ml、0.5μg/ml、0μg/mlの各濃度において入れ、全てのwellに細胞障害型アデノウイルスAdE3-IAI.3Bを入れ、5日後にアデノウイルスの増殖抑制効果をIC50で評価した。その結果を図16に示す。図中縦軸は、各場合におけるIC50のウイルス投与量(vp/cell)を相対的に示すものである。同図に示すように、ALA 50μg/mlおよびアデノウイルスを併用した場合は、アデノウイルス単独に比べ約100倍の増殖抑制効果を示した。

【0082】

さらに、卵巣癌細胞株HEYを12well dishに10000/well播いた後、翌日にFeSO₄を50μg/ml、5μg/ml、0.5μg/ml、0μg/mlの各濃度において入れ、各wellに細胞障害型アデノウイルスAdE3-IAI.3Bおよび5-aminolevulinic acid(ALA) 50μg/ml、又はコントロールとしてアデノウイルス単独を入れ、5日後にアデノウイルスの増殖抑制効果をIC50で評価した。その結果を図17に示す。図中縦軸は、各場合におけるIC50のウイルス投与量(vp/cell)を相対的に示すものである。同図に示すように、FeSO₄ 50μg/ml、ALA 50μg/mlおよびアデノウイルスを併用した場合は、アデノウイルス単独に比べ、約1000倍の増殖抑制効果を示し、FeSO₄ 5μg/ml、ALA 50μg/mlおよびアデノウイルス併用した場合は、アデノウイルス単独に比べ、約700倍の増殖抑制効果を示した。

し、 FeSO_4 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 、ALA $50 \mu\text{g/ml}$ およびアデノウイルスを併用した場合では、アデノウイルス単独に比べ、約 200 倍の増殖抑制効果を示した。

【0083】

以上のように、ALA および Fe は、オンコリティックアデノウイルス AdE3-IAI.3B の増殖抑制効果を著しく亢進することが明らかとなった。この理由は、PFU assay によりアデノウイルスの産生量の増加によることが明らかとなっており、ALA および Fe は、アデノウイルスの産生量を増加させること、つまりアデノウイルスの癌細胞内における産生量増加とともに抗腫瘍効果を著しく高めることが明らかとなった。

【0084】

ALA は、ポルフィリンで従来より癌細胞に取り込まれやすいことが知られており、代謝されて protoporphyrin IX となり、これが光増感作用を有することよりエキシマダイレーザーと併用され、表在性癌の PDT 治療 (photodynamic therapy) に用いられてきた。

【0085】

上記 protoporphyrin IX は、Fe と結合することにより heme となり、細胞内で cytochrome 等の heme 蛋白を形成する。この heme 蛋白は、細胞内ミトコンドリアで呼吸器系に関与しており、ATP 産生に働き蛋白合成に関与する。このように、heme 蛋白は、アデノウイルス感染時のアデノウイルス産生のための蛋白合成に関与するため、これらポルフィリン代謝が亢進することは、アデノウイルス産生増加につながる可能性が高いと考えられる。

【0086】

したがって、本発明の癌遺伝子治療薬、癌遺伝子治療方法において、これら Fe および／又は ALA 等のポルフィリン化合物を併用することにより、さらに治療効果を高めることが期待できる。即ち、Fe および／又は ALA 等のポルフィリン化合物を併用することにより、直接的な抗腫瘍効果の増加、さらには抗体存在下の感染抑制状態において、標的細胞のアデノウイルス産生増加による CTL response の亢進により、syngenic mouse model において抗腫瘍効果が高まり、ヒトにおいても同様な良好な抗腫瘍効果を呈するものと考えられる。

【0087】

また、オンコリティックウイルスを用いた癌遺伝子治療において、キャリアー細胞を使用しない場合であっても、Fe および／又は ALA 等のポルフィリン化合物を併用することにより、治療効果を高めることが期待できる。

【産業上の利用可能性】

【0088】

以上のように、本発明の癌遺伝子治療薬は、ほぼ全ての悪性腫瘍に適用することができ、卵巣癌、扁平上皮癌（子宮頸部癌、皮膚癌、頭頸部癌、食道癌、肺癌等）、消化器癌（大腸癌、膵癌、肝癌、胃癌等）、神経芽細胞腫、脳腫瘍、乳癌、精巣癌、前立腺癌など各種癌に対する強力な抗腫瘍効果が期待できる。

【図面の簡単な説明】

【0089】

【図1】各種細胞株をキャリアー細胞に用いた場合の癌細胞増殖抑制効果を調べた結果を示すグラフである。

【図2】オンコリティックウイルス単独の場合とキャリアー細胞を用いた場合とで、ウイルス抗体存在下、癌細胞増殖抑制効果がどのように変化するか調べた結果を示すグラフである。

【図3】オンコリティックアデノウイルス感染 293 細胞などについて、ウイルス抗体存在下の癌細胞増殖抑制効果を調べた結果を示すグラフである。

【図4】293 細胞、A549 細胞、SW626 細胞、HT-111 細胞の各キャリアー細胞について、ウイルス抗体存在下の癌細胞増殖抑制効果を調べた結果を示すグラフである。

【図5】ヌードマウスの皮下にヒト卵巣癌細胞 RMG-1 を移植した腫瘍モデルを用いて本発明の癌遺伝子治療薬の in vivo 抗腫瘍効果を検討した結果を示すグラフである。

る。

【図6】ヌードマウスの皮下にヒト卵巣癌細胞PA-1を移植した腫瘍モデルを用いて本発明の癌遺伝子治療薬のin vivo抗腫瘍効果を検討した結果を示すグラフである。

【図7】免疫機能が正常な皮下腫瘍モデルマウスを用いて本発明の癌遺伝子治療薬のin vivo抗腫瘍効果を検討した結果を示すグラフである。

【図8】アデノウイルス投与による細胞融合を顕微鏡により観察した図である。

【図9】コントロールであり、アデノウイルスを投与しなかったA549細胞を顕微鏡により観察した図である。

【図10】(a)は、1~21のヒト手術標本におけるミッドカイン(MK)mRNAの発現をRT-PCRで検討した結果、(b)は、同様の方法により、悪性グリオーマの4つの細胞株におけるミッドカインmRNAの発現をRT-PCRで検討した結果、(c)は、上記各細胞株におけるミッドカインの発現をウエスタンブロット解析によって検討した結果、である。

【図11】長さが異なる2つのミッドカインプロモーターを用いて上記各細胞株におけるプロモーター活性を比較した結果を示すグラフである。

【図12】(a)は、今回設計した、ミッドカインプロモーターを有するオンコリテイクアデノウイルスの構造を模式的に示す図であり、(b)は、3種類のアデノウイルスを上記各細胞株に感染させ、それぞれの細胞株におけるE1A蛋白の発現をウエスタンブロット解析によって検討した結果である。

【図13】(a)は、3種類のアデノウイルスによる癌細胞増殖抑制効果を比較検討した結果であり、(b)は、アデノウイルスのE3領域の増殖抑制効果に与える影響を検討した結果であり、(c)は、ヌードマウス皮下移植モデルにおけるアデノウイルスの抗腫瘍効果を検討した結果である。

【図14】ミッドカインプロモーターを有するオンコリテイクウイルスをキャリア細胞に感染させて本発明の癌遺伝子治療薬を調製し、その抗腫瘍効果をウイルス単独投与の場合と比較した結果を示すグラフである。

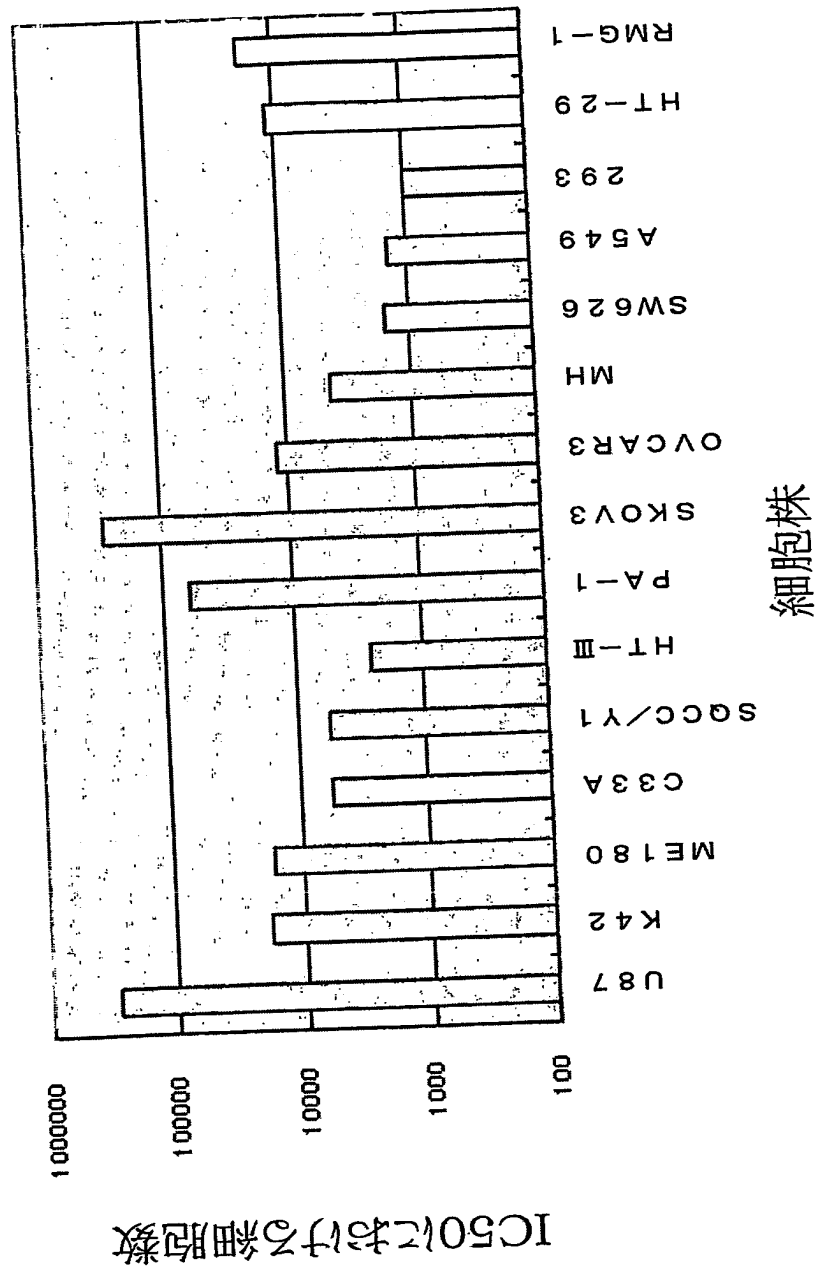
【図15】アデノウイルスAdE3-IAI.3Bの増殖抑制効果に対するFeの影響を検討した結果を示すグラフである。

【図16】アデノウイルスAdE3-IAI.3Bの増殖抑制効果に対するALAの影響を検討した結果を示すグラフである。

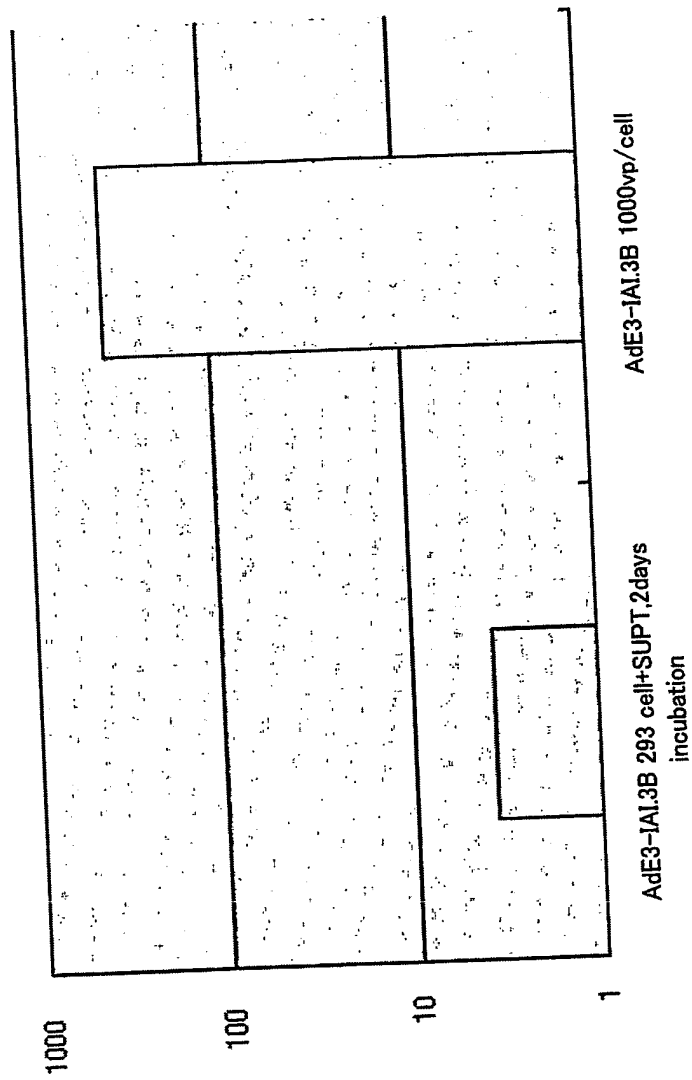
【図17】アデノウイルスAdE3-IAI.3Bの増殖抑制効果に対するFeおよびALA両存在下の影響を検討した結果を示すグラフである。

【書類名】 図面
【図 1】

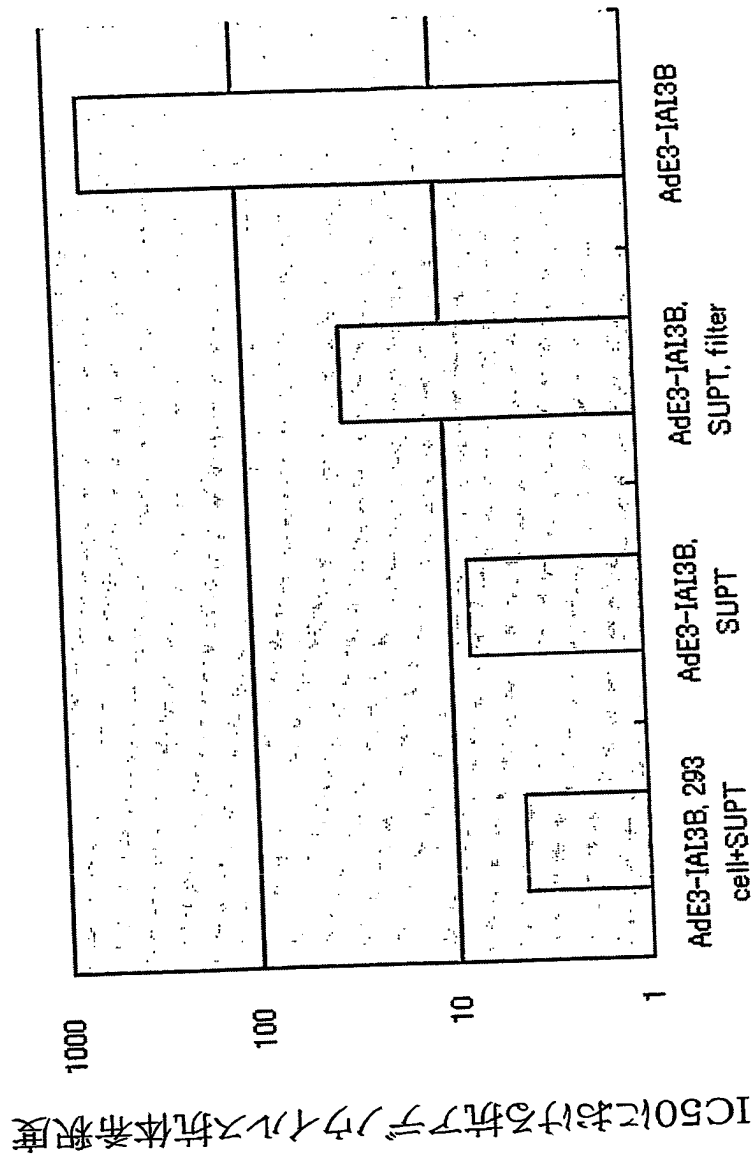
各細胞株の癌細胞増殖抑制効果



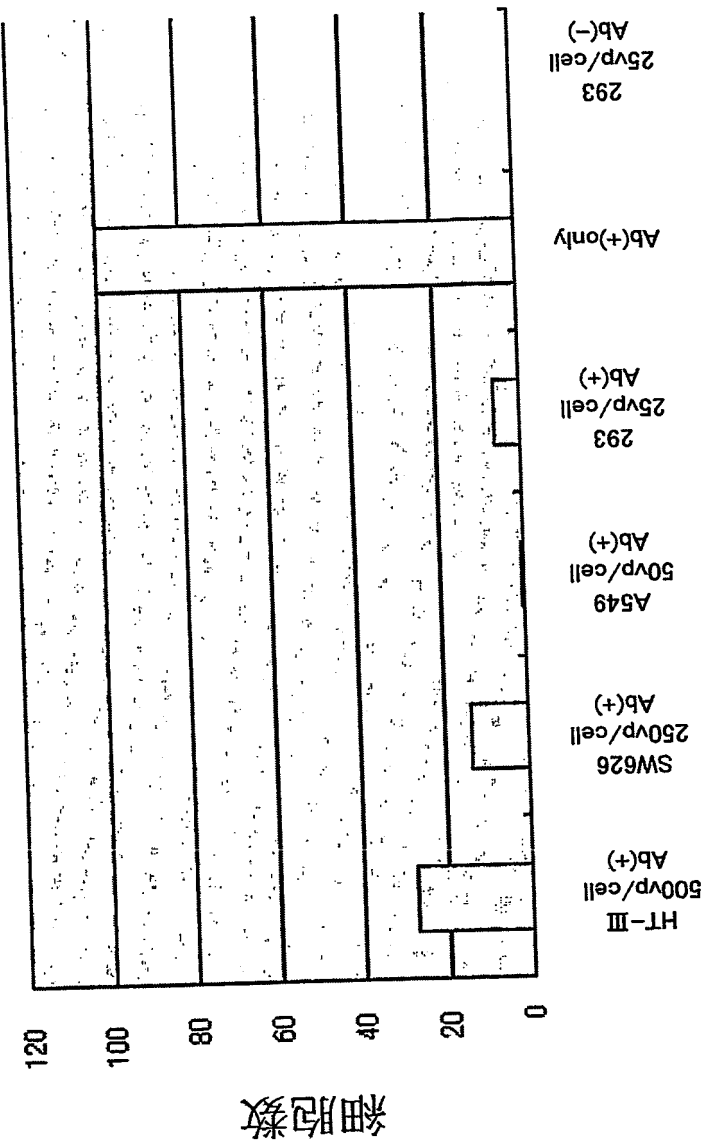
【図 2】



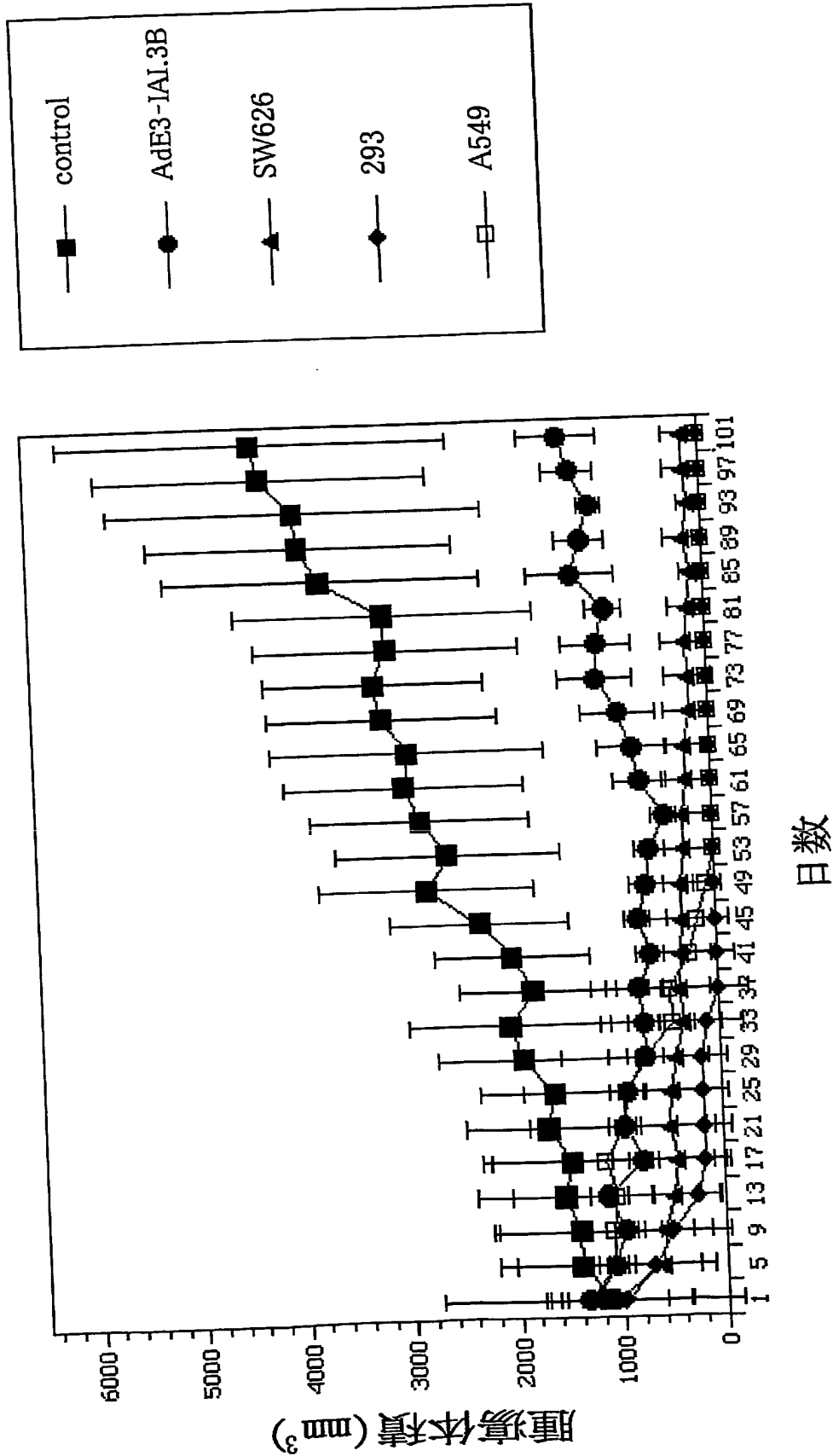
【図 3】



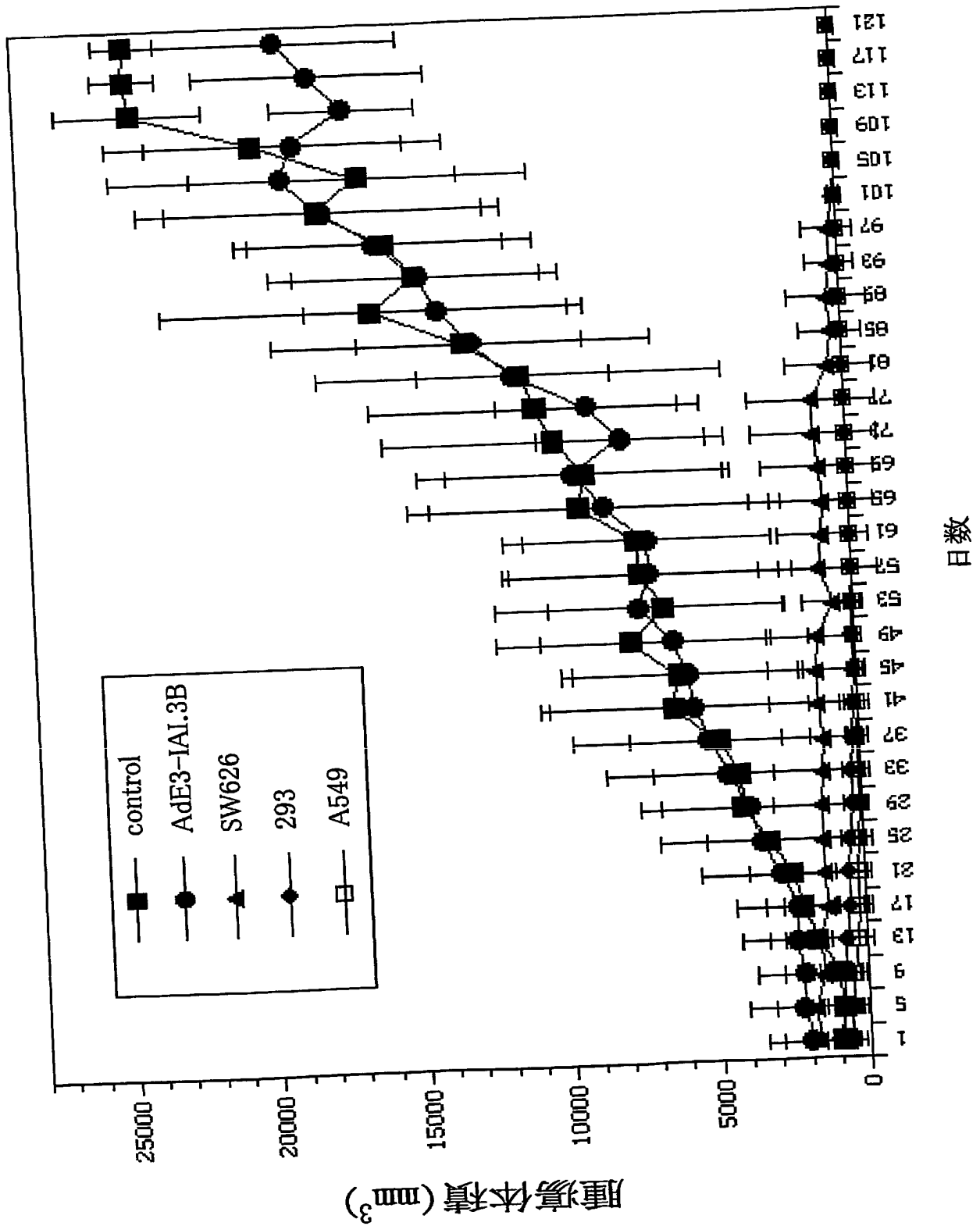
【図4】



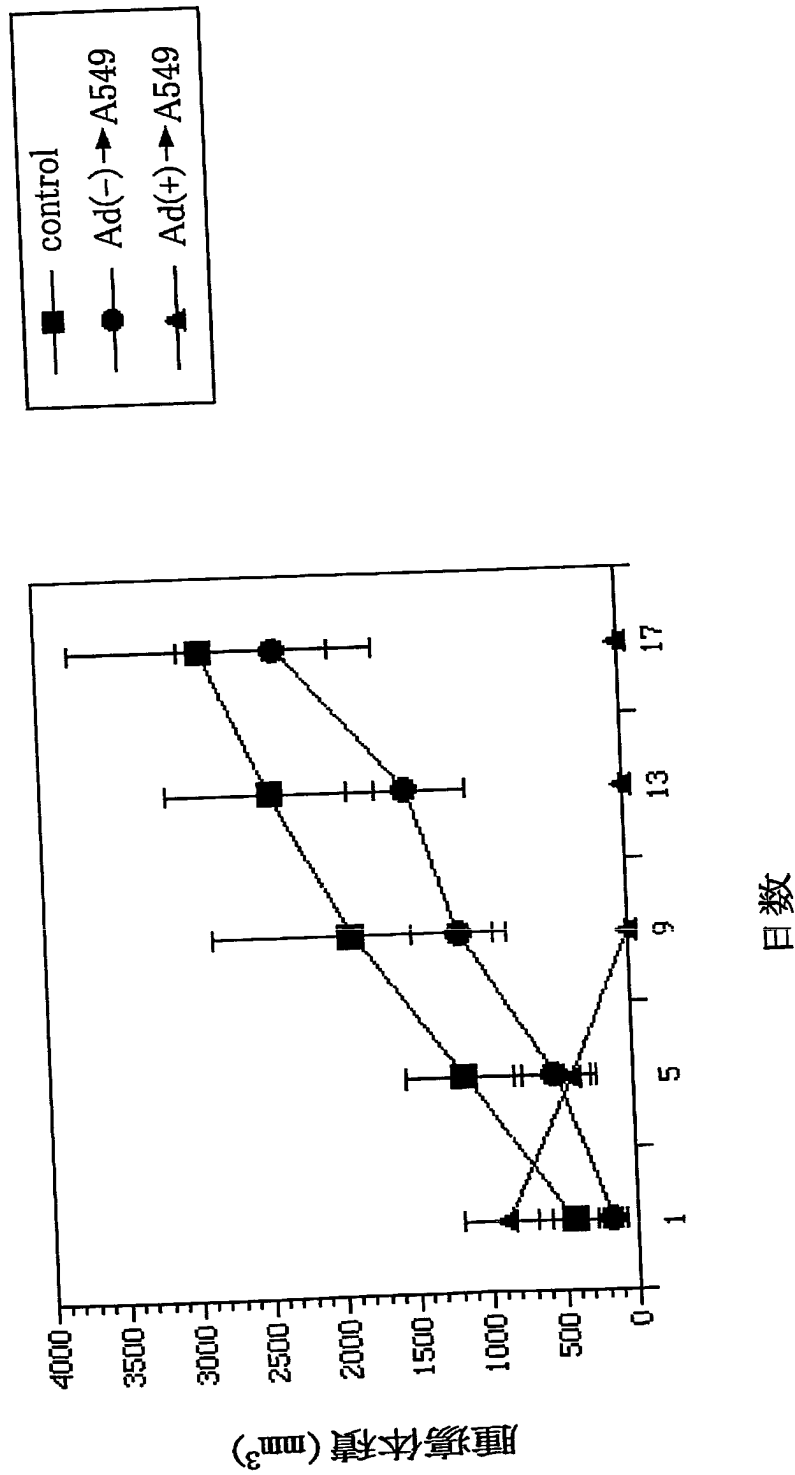
【図 5】



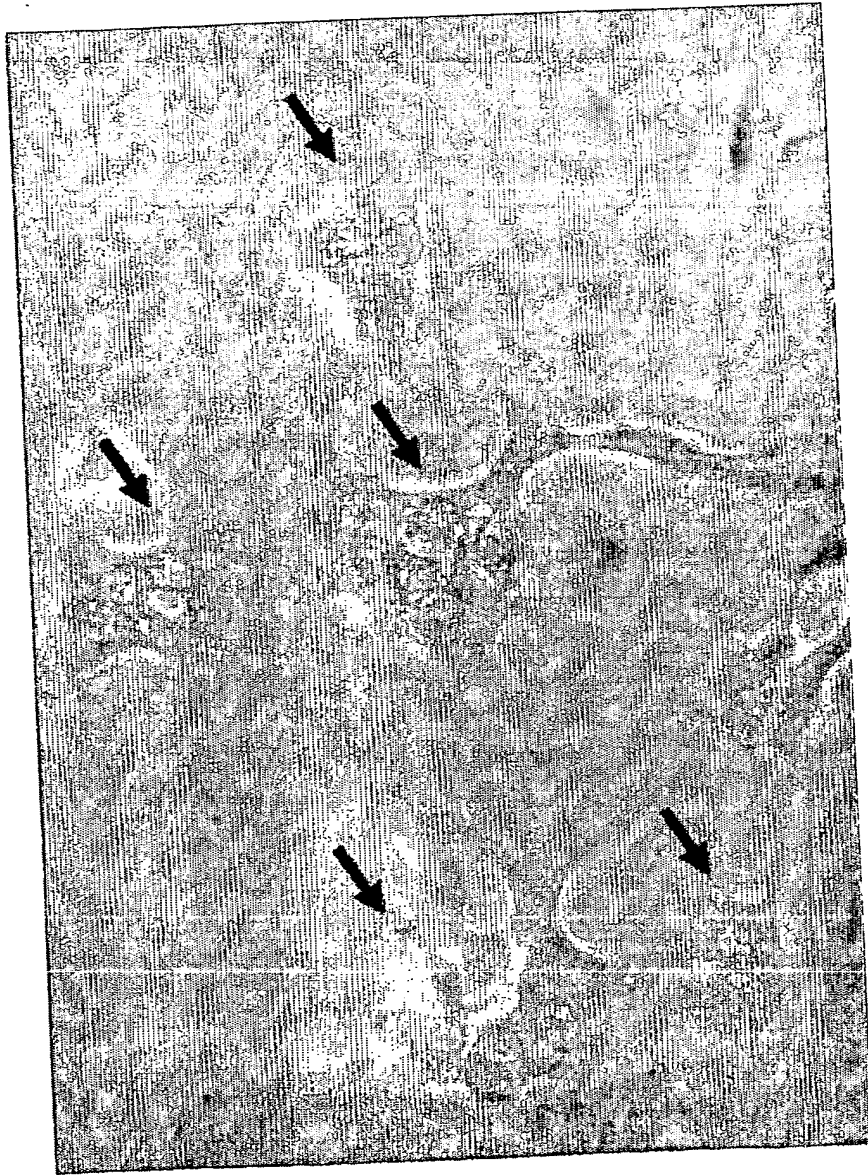
【図6】



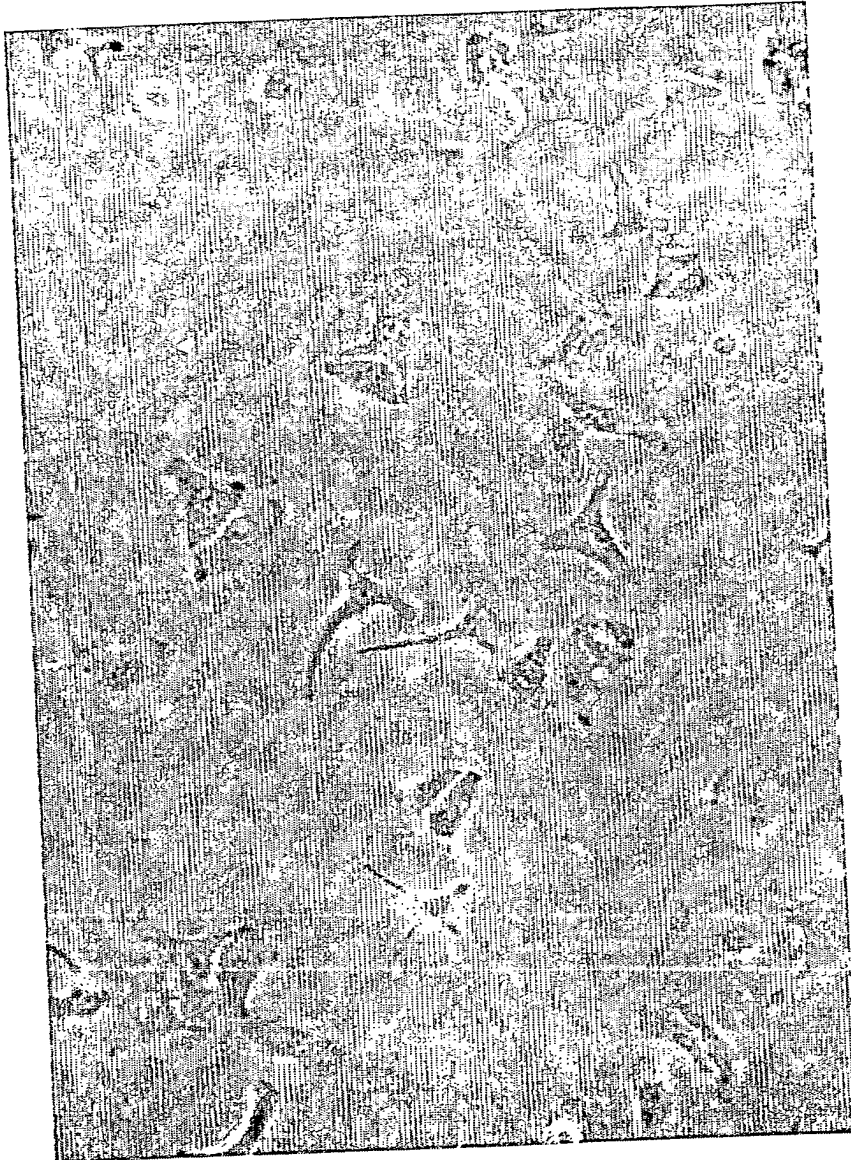
【図 7】



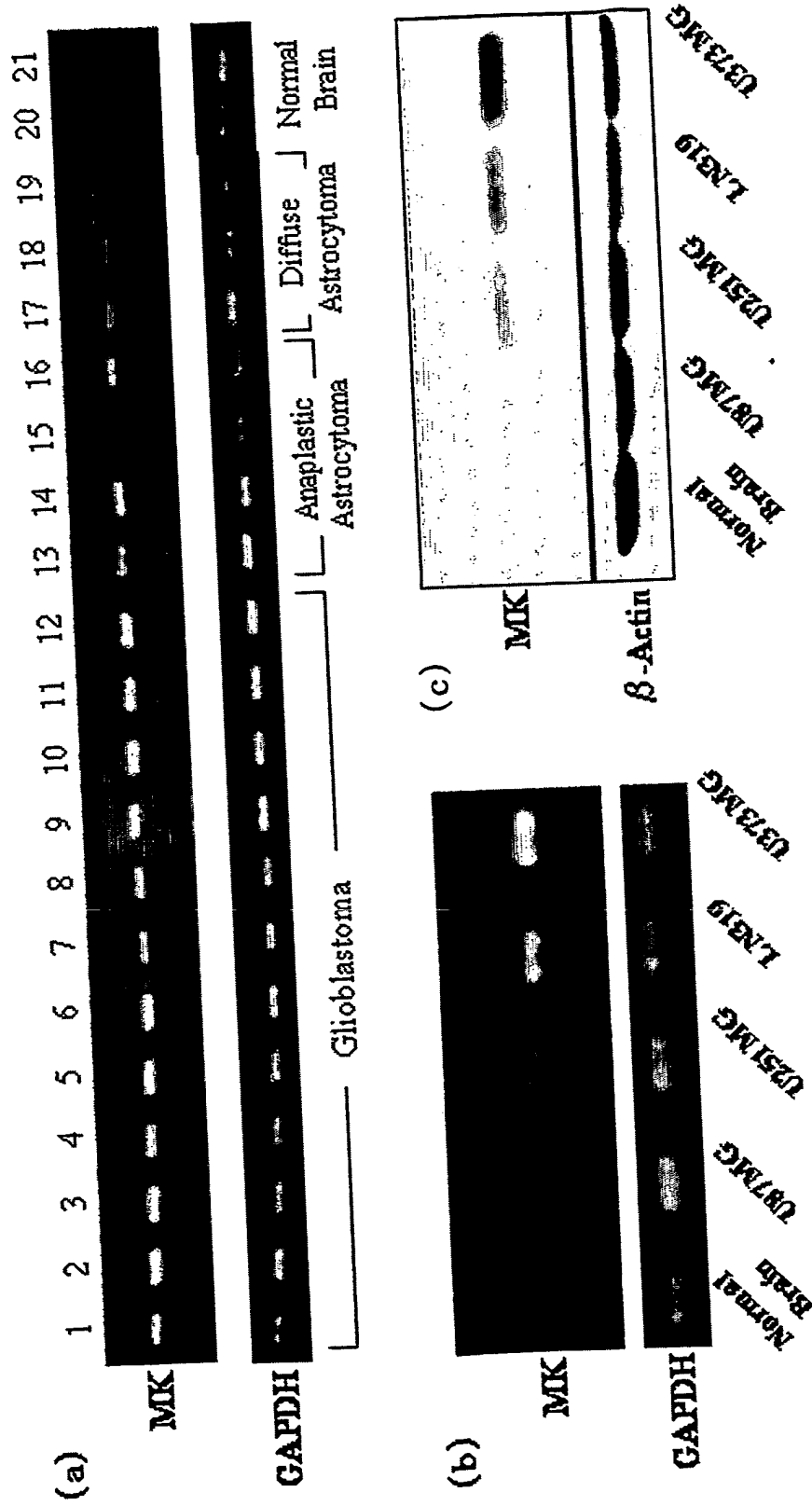
【図 8】



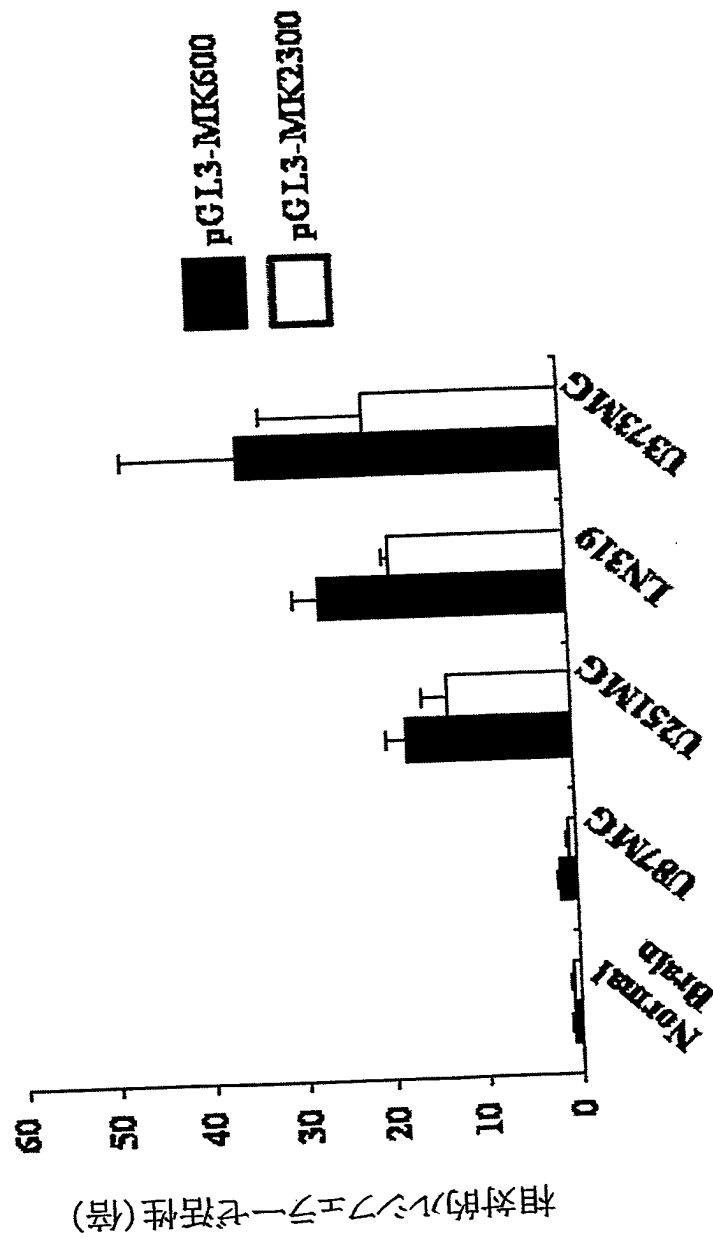
【図 9】



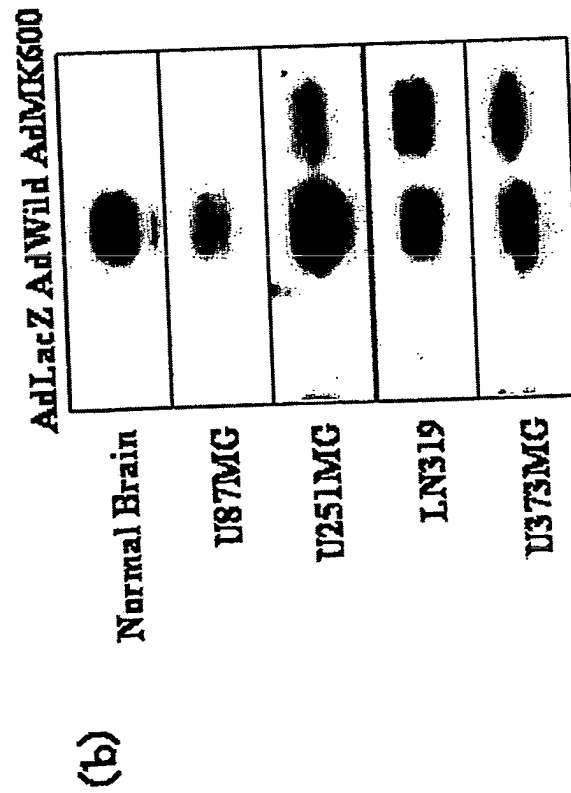
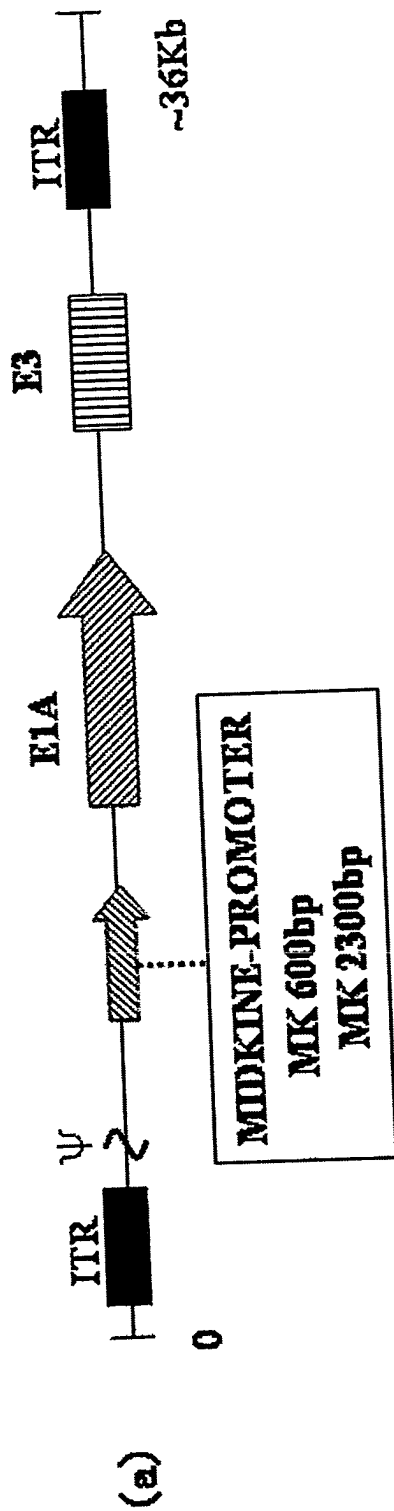
【図10】



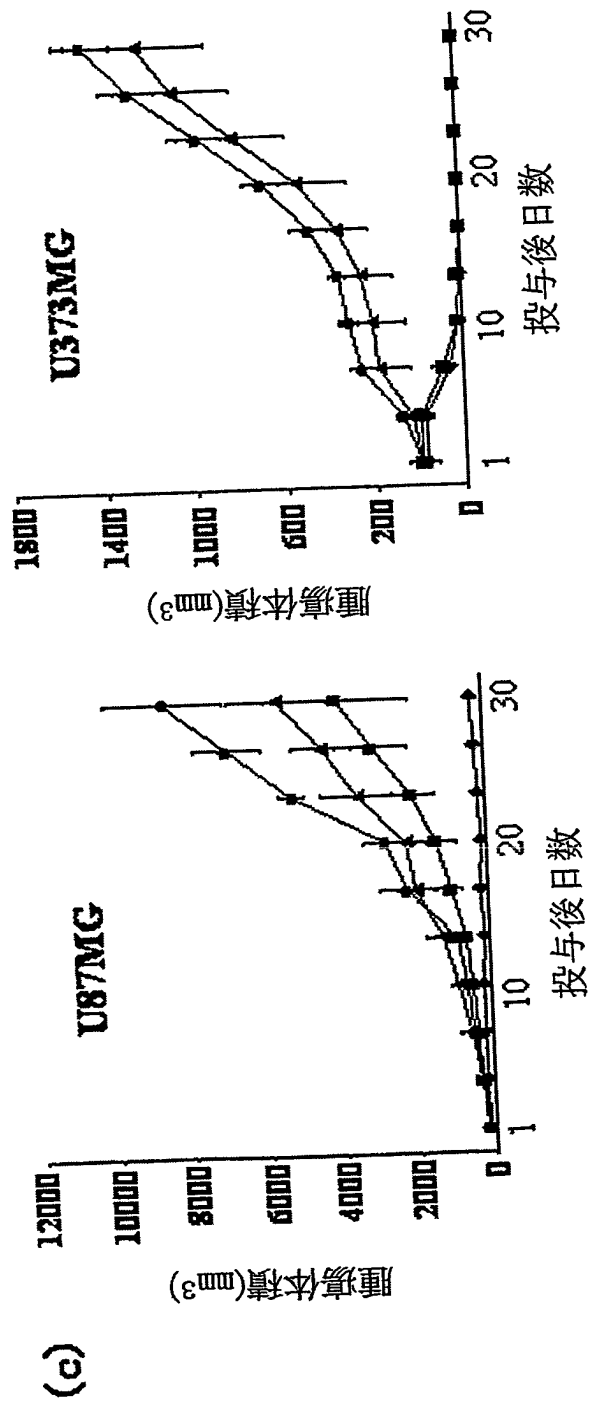
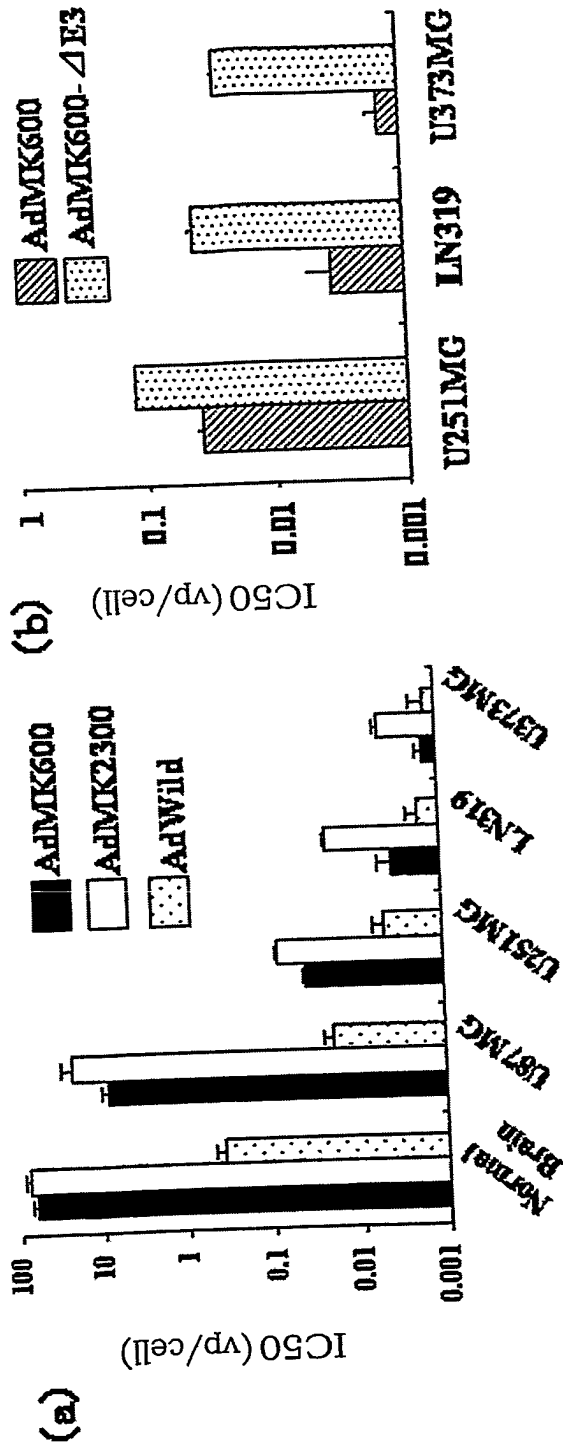
【図 11】



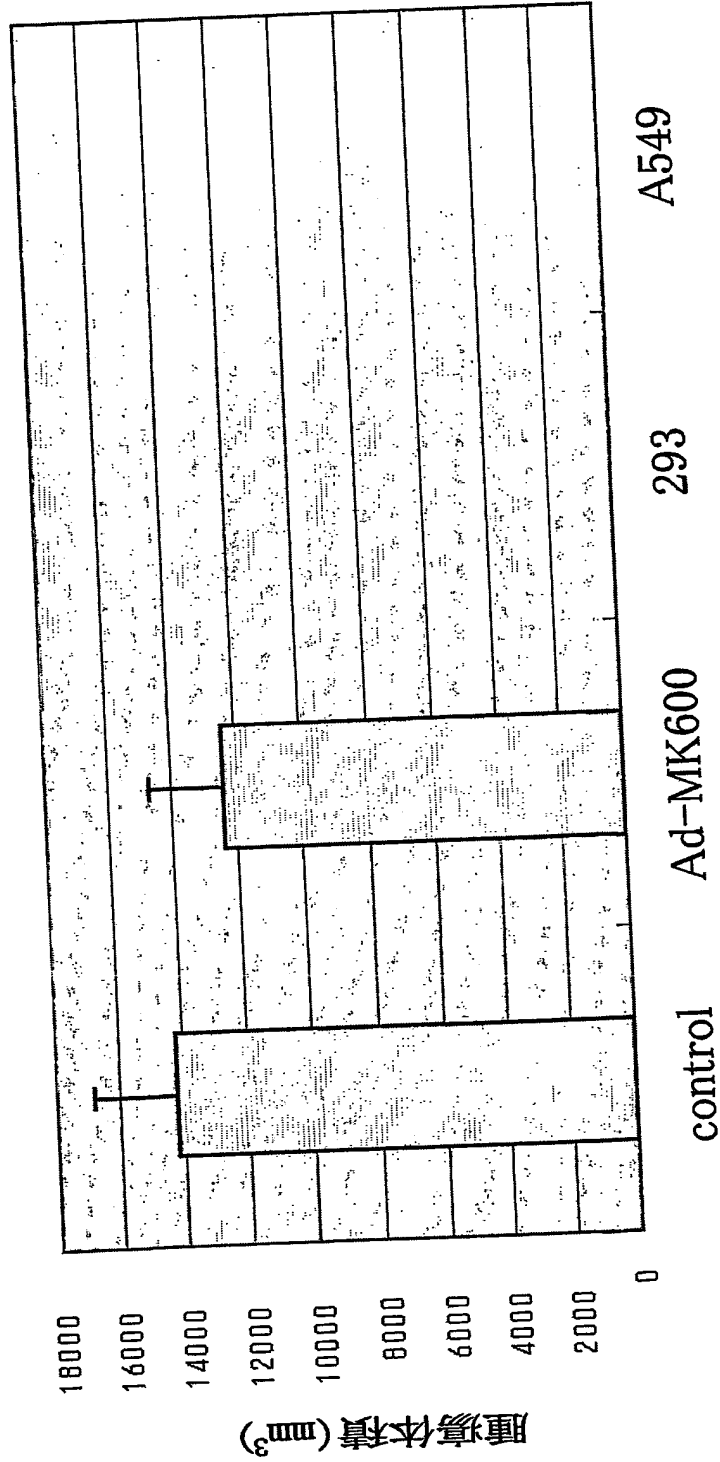
【図 1 2】



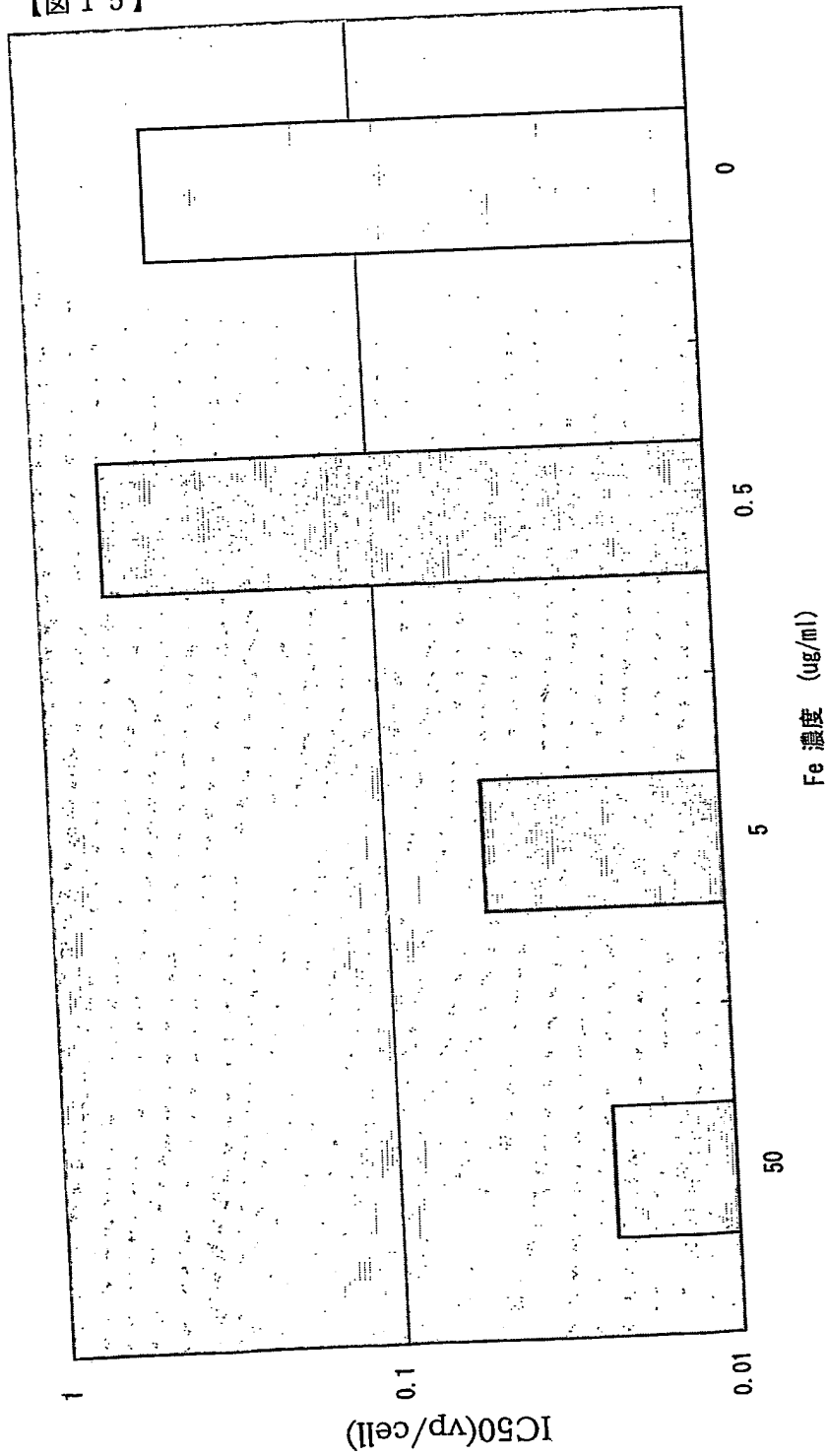
【図13】



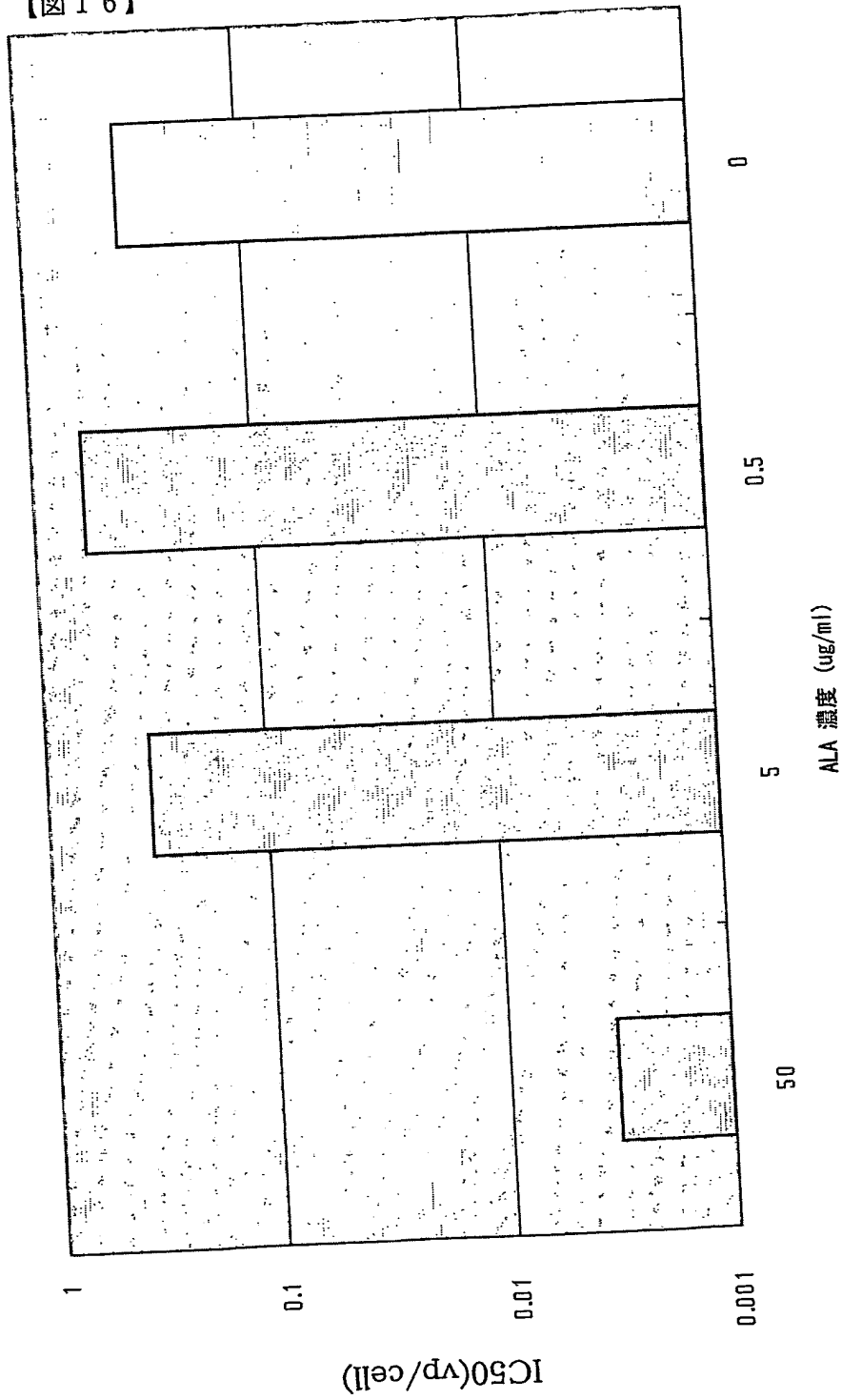
【図 14】



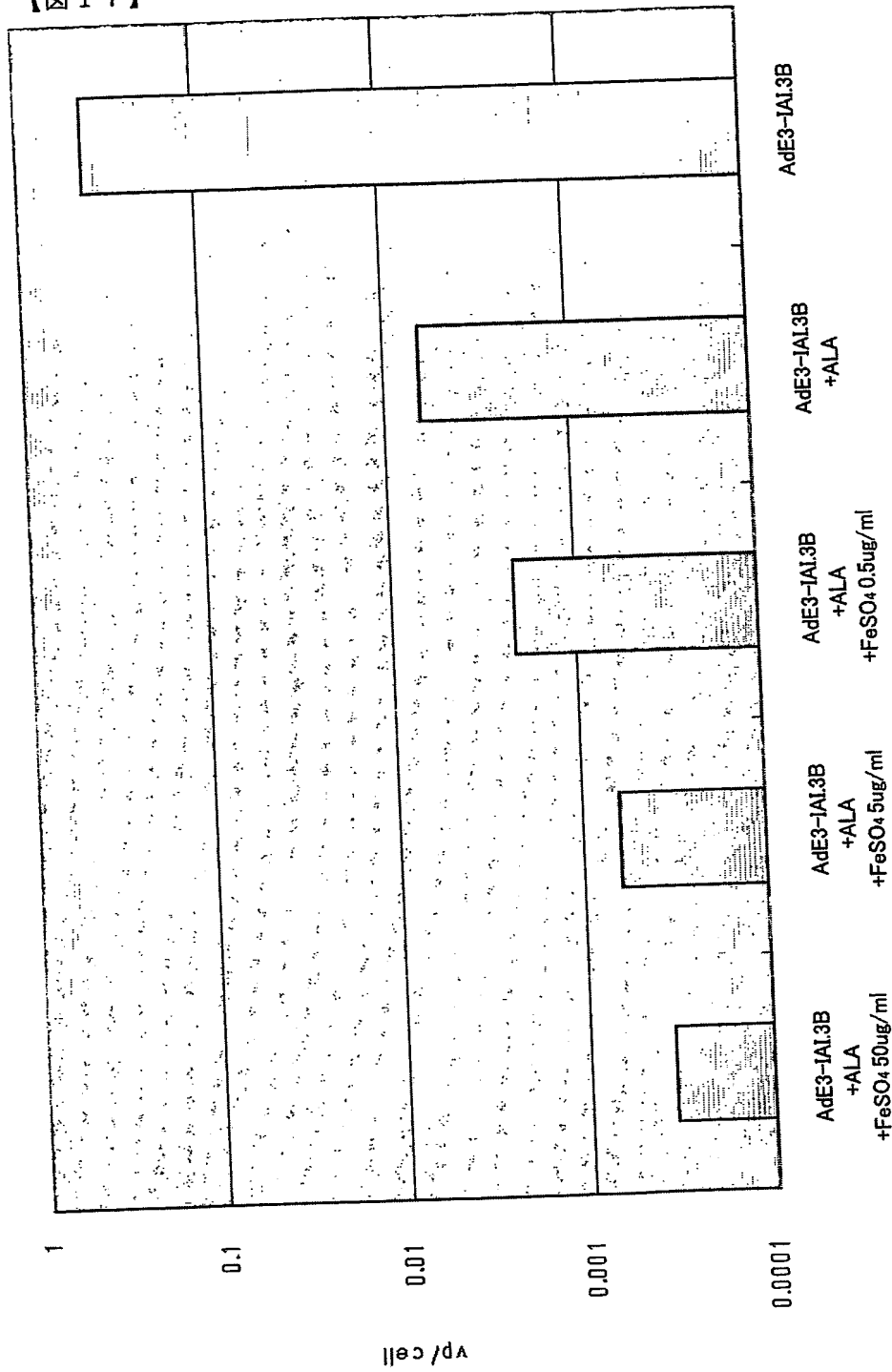
【図 15】



【図 16】



【図 17】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 オンコリティックウイルスを用いた癌遺伝子治療において、強力な抗腫瘍効果が得られる新たなキャリアー細胞を見出すこと。また、劇的な抗腫瘍効果が得られる新たな癌遺伝子治療法を確立し、同治療法に用いる新たな癌遺伝子治療薬を提供すること。

【解決手段】 本発明の第一の癌遺伝子治療薬は、オンコリティックウイルスを感染させ、同ウイルスを腫瘍細胞に作用させるためのキャリアー細胞を含み、当該キャリアー細胞には、強力な抗腫瘍効果が認められたA549細胞、293細胞、SW626細胞、HT-1080細胞のいずれかが使用される。また、本発明の第二の癌遺伝子治療薬は、生体のCTL反応を誘導するために投与される免疫処置用ウイルスと、オンコリティックウイルスを感染させ、同ウイルスを生体の腫瘍細胞に作用させるためのキャリアー細胞とを組み合わせたものである。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 3 5 4 9 8 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[8 0 0 0 0 0 0 5 7]

1. 変更年月日

2 0 0 0 年 1 2 月 6 日

[変更理由]

名称変更

住 所

兵庫県神戸市中央区港島南町 1 丁目 5 - 2

氏 名

財団法人新産業創造研究機構

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.